

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II



FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dottorato in Scienze Chimiche
XVIII ciclo
2002-2005

Studi strutturali di ribonucleasi ricombinanti

Candidato
Carmine Ercole

Tutore
Prof. D. Picone

Relatore
Prof. L. Mazzarella

Coordinatore Prof. R. Lanzetta

INDICE

ABBREVIAZIONI		3
SOMMARIO		5
ABSTRACT		13
CAPITOLO 1	INTRODUZIONE	
1.1.	<i>Domain swapping</i>	20
1.1.1	Meccanismo	23
1.1.2	<i>Domain swapping</i> nelle ribonucleasi	25
1.2.	Studi strutturali	27
1.2.1.	RNasi A	27
1.2.2.	Dimero N della RNasi A	28
1.2.3.	Dimero C della RNasi A	30
1.2.4.	PM8/HP RNasi	30
1.2.5.	BS-RNasi	32
1.2.6.	NCD BS-RNasi	33
1.3.	Attività catalitica delle ribonucleasi	34
1.3.1.	Attività ribonucleasica	34
1.3.2.	Proprietà biologiche speciali	37
1.4.	Alterazione della propensione allo <i>swapping</i>	39
1.5.	Studi di mutagenesi sul modello delle ribonucleasi	41
1.6.	Progetto di tesi	43
CAPITOLO 2	MATERIALI E METODI	
2.1.	Mutagenesi	48
2.1.1.	Mutagenesi sito-specifica mediante PCR	48
2.1.2.	Metodo del “Megaprimer”	51
2.1.3.	Reazione a catena della DNA polimerasi	54
2.2.	Clonaggio	55
2.2.1.	Idrolisi catalizzata da enzimi di restrizione	55
2.2.2.	Elettroforesi di DNA su gel di agarosio	56
2.2.3.	Estrazione e purificazione di DNA da gel	56
2.2.4.	Reazione di ligasi	56
2.2.5.	Preparazione cellule competenti	57
2.2.6.	Trasformazione chimica	57
2.2.7.	Preparazione di DNA plasmidico in piccola scala (minipreparazione)	57
2.2.8.	Preparazione campione per sequenza	58
2.3.	Espressione e purificazione delle proteine	58

2.3.1.	Derivato monomerico	58
2.3.2.	Riduzione selettiva	60
2.3.3.	Alchilazione del monomero con Iodoacetammide	60
2.3.4.	Dimerizzazione	61
2.3.5.	Preparazione dei dimeri in condizioni denaturanti della RNasi A	61
2.3.6.	Dimeri non covalenti della BS-RNasi (NCD)	61
2.3.7.	Saggi di attività: saggi Kunitz	62
2.4.	Caratterizzazione strutturale	62
2.4.1.	Misure CD	63
2.4.2.	Misure NMR	63
2.5.	Analisi dell'interconversione	64
2.5.1.	Cromatografia FPLC	64
2.5.2.	Tecnica del "Cross-Linking"	65
2.5.3.	Gel nativi	65
2.5.4.	Dissociazione termica delle proteine	66
2.6.	Dati cristallografici	67
CAPITOLO 3	RISULTATI E DISCUSSIONI	
3.1.	Preparazione e caratterizzazione dei derivati monomerici	68
3.2.	NMR	70
3.3.	Analisi dell'interconversione	76
3.4.	<i>Swapping</i> in condizioni non fisiologiche	80
3.5.	Dissociazione termica delle proteine	85
3.6.	Dati cristallografici	87
CAPITOLO 4	CONCLUSIONI	90
BIBLIOGRAFIA		97
RINGRAZIAMENTI		102

Abbreviazioni

1D, 2D and 3D: mono-, bi e tri-dimensionale;

NMR: risonanza magnetica nucleare;

CD: dicroismo circolare;

BS-RNasi: ribonucleasi seminale bovina;

DTT: ditionitrotolo;

DVS: divinil sulfone;

IPTG: isopropil- β -D-tiogalattopiranoside;

mBS: variante N67D del derivato monomerico della BS-RNasi con le cisteine 31 e 32 bloccate con glutatione;

mBS_{IAA}: variante N67D del derivato monomerico della BS-RNasi con le cisteine 31 e 32 bloccate con iodoacetammide;

RNasi A: ribonucleasi pancreatica bovina;

P19A-mBS: mutante P19A di mBS;

L28Q-mBS: mutante L28Q di mBS;

PALQ-mBS: mutante P19A/L28Q di mBS;

STA-mBS: mutante G16S/N17T/P19A di mBS

hA-mBS: mutante G16S/N17T/P19A/S20A di mBS;

hA-mBS_{IAA}: mutante G16S/N17T/P19A/S20A di mBS con le cisteine 31 e 32 bloccate con iodoacetammide;

R80S-mBS: mutante R80S di mBS;

R80S/hA-mBS: mutante R80S/G16S/N17T/P19A/S20A di mBS;

hBS-RNasi A: mutante S16G/T17N/A19P/A20S della RNasi A;

P19A-BS-RNasi: mutante P19A della BS-RNasi;

L28Q-BS-RNasi: mutante L28Q della BS-RNasi;

PALQ-BS-RNasi: mutante P19A/L28Q della BS-RNasi;

hA-BS-RNasi: mutante G16S/N17T/P19A/S20A della BS-RNasi;

R80S-BS-RNasi: mutante R80S della BS-RNasi;

R80S/hA-BS-RNasi: mutante R80S/G16S/N17T/P19A/S20A della BS-RNasi;

NCD: dimero non covalente della BS-RNasi;

***hA*-NCD:** dimero non covalente di “hA”-BS-RNasi

dC-RNasi A: dimero C-terminale della RNasi A;

dN-RNasi A: dimero N-terminale della RNasi A;

HP-RNasi: ribonucleasi pancreatica umana;

PM8: mutante della HP-RNasi (chiamato PM8), in cui i residui 1-22 e il residuo 101 sono stati sostituiti con i corrispondenti residui della BS-RNasi.

Sommario

Negli ultimi anni sono stati proposti diversi meccanismi che potessero spiegare l'evoluzione delle proteine oligomeriche a partire dai corrispettivi monomeri, ed uno di questi è il 3D *domain swapping* (Bennet et al., 1995). Con tale termine si intende un fenomeno che prevede la dislocazione di un dominio (in alcuni casi uno o più elementi strutturali) di un monomero nel corpo di un'altra subunità monomerica identica, in cui va ad occupare il posto del corrispondente tratto di catena polipeptidica.

In Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/) sono state finora depositate oltre 50 strutture di proteine caratterizzate dal fenomeno del *domain swapping* e da un'analisi di queste è emerso che non è possibile stabilire delle analogie di funzioni, dimensioni o sequenze, e ciò impedisce, nota una proteina e la sua sequenza, stabilire a priori se questa scambierà un dominio o meno. Sebbene i domini interessati siano, nella maggioranza dei casi, N- o C-terminali, non vi è alcuna limitazione in merito in quanto in qualche caso è stato osservato lo scambio di una regione centrale della proteina. E' inoltre possibile addirittura lo scambio simultaneo di entrambe le regioni (Liu et al., 2002).

L'interesse addizionale nello studio del 3D *domain swapping* è dovuto alla possibilità di poter collegare questo processo a un meccanismo di oligomerizzazione patologica, come nel caso della formazione di fibrille amiloidi (Klafki et al. 1993). Altra ipotesi sul significato biologico del *domain swapping* (Bennett & Eisenberg, 2004) suppone che questo meccanismo sia stato utilizzato in modo transiente nel corso dell'evoluzione di una proteina per acquisire una struttura quaternaria vicina a quella definitiva, anche se attualmente la proteina non presenta domini scambiati.

Due membri della superfamiglia delle ribonucleasi forniscono dei modelli di particolare interesse per lo studio del fenomeno dello scambio di domini per la contemporanea presenza del prototipo monomerico, la ribonucleasi pancreatica bovina (RNasi A), e la controparte dimerica naturale, la ribonucleasi seminale bovina (BS-RNasi).

Va ricordato che nonostante il concetto di *domain swapping* sia relativamente recente in realtà il fenomeno è stato ipotizzato per la prima volta più di 40 anni fa proprio nel caso della ribonucleasi pancreatica bovina (RNasi A), quando fu ritrovato che la proteina liofilizzata da acido acetico al 40 % formava dimeri e altri oligomeri (Crestfield et al. 1962). La risoluzione delle strutture cristallografiche dei due dimeri ha mostrato che in uno è presente la dislocazione dell' α -elica N-terminale (Liu, Y., et al. 1998), mentre nell'altra il dimero mostra la dislocazione dei β -strands C-terminali (Liu, Y., et al. 2001).

L'unico membro appartenente alla famiglia delle ribonucleasi esistente sotto forma di dimero in condizioni fisiologiche è la BS-RNasi, un omodimero, in cui le due subunità sono tenute insieme da due ponti disolfurici intercatena. Il dimero così formato dà luogo a due isoforme dotate di diversa struttura terziaria: in una la coda N-terminale (residui 1-15) di ciascuna catena polipeptidica interagisce con il corpo (23-124) dell'altra subunità (MxM, o dimero scambiato), nell'altra tale scambio non avviene e il segmento N-terminale interagisce con il corpo della propria subunità (M=M, o dimero non scambiato). In soluzione le due isoforme si interconvertono rapidamente tra di loro per raggiungere un equilibrio di 2/1 tra MxM e M=M (Piccoli et al., 1992). La proteina mostra varie singolarità biologiche tra le quali spicca una elevata attività antitumorale che sembra essere relazionabile alla sua capacità di sfuggire all'inibitore di ribonucleasi (RI). Questa attività è una proprietà peculiare della isoforma MxM: nell'ambiente riducente del citosol M=M si dissocia nelle sue due componenti monomeriche, mentre MxM rimane come dimero non covalente (denominato NCD). La costruzione di un modello tra NCD e l'inibitore delle ribonucleasi (RI) rivela che questo dimero è dotato di una struttura quaternaria tale da poter interferire con il legame all'inibitore stesso (Sica et al., 2004) e sarebbe quindi il responsabile, nelle condizioni riducenti del citosol, delle proprietà biologiche speciali della BS-RNasi.

L'unicità del caso della BS-RNasi, rispetto a tutti gli altri presi in considerazione, consiste nel fatto che il fenomeno dell'interscambio di domini non prevede una

conversione monomero-dimero ma un equilibrio tra due forme dimeriche. La presenza dei ponti disolfurici intercatena fa perdere l'extra grado di libertà conformazionale che favorisce le forme dimeriche nell'equilibrio monomero-dimero e permette di estrapolare i contributi di specifici residui nel *domain swapping*.

Questo lavoro di tesi ha previsto l'individuazione dei determinanti strutturali responsabili del fenomeno dell'interscambio di domini nelle ribonucleasi mediante mutagenesi per omologia: considerando la RNasi A come prototipo monomero e la BS-RNasi come prototipo dimerico della famiglia delle ribonucleasi si è proceduto con la mutazione del residuo o dei residui, delle regioni principalmente coinvolte nel fenomeno (regione cerniera, interfaccia aperta e regioni che interagiscono con l'*hinge*), di un prototipo con i corrispondenti residui presente nella controparte.

Dati NMR ottenuti sul derivato monomero della BS-RNasi (mBS) (Avitabile et al., 2003) indicano che la regione più flessibile della BS-RNasi è il peptide *hinge* (residui 16-22), cioè il segmento della catena polipeptidica che connette il dominio scambiato al corpo della proteina, che è anche la regione che presenta le maggiori differenze di sequenza amminoacidica con la RNasi A. E' stato dimostrato che uno dei ruoli più critici per la trasformazione monomero-dimero è svolto dal peptide cerniera e che l'introduzione di mutazioni, l'allungamento o accorciamento di questa regione possono cambiare il rapporto tra monomero e oligomero scambiato (Rousseau et al., 2003). Il peptide cerniera è l'unica regione che cambia conformazione nella trasformazione e da più parti ipotizzato che uno dei residui principalmente coinvolti nello *swapping* sia la prolina (Bergdoll et al., 1997). Per questo motivo nel corso di questo lavoro ho focalizzato inizialmente l'attenzione sulla Pro19 che si trova nell'*hinge* e sulla Leu28 che invece si trova all'interfaccia aperta (regione di interazione di due subunità monomeriche che si scambiano i domini) e forma delle interazioni idrofobiche tra le catene laterali dei due residui. E' stato quindi progettato un mutante nel quale la Leu28 è stata sostituita con la Glu (L28Q-mBS), ed un secondo mutante contenente entrambe le mutazioni P19AL28Q-mBS (denominato PALQ-mBS). Studi di mutagenesi precedentemente effettuati sulla RNasi A avevano

mostrato l'importanza di questi residui entrambi essenziali sia per la dimerizzazione sia per l'interscambio delle estremità N-terminali insieme alle due cisteine 31 e 32 responsabili dei ponti disolfurici intercatena (Di Donato et al., 1994).

Onde poter chiarire il ruolo effettivo giocato dal peptide cerniera nel fenomeno dell'interscambio di domini sono stati preparati il mutante denominato *hA*-mBS in cui l'intero *hinge* della BS-RNasi è stato sostituito con i corrispondenti residui della RNasi A e quello denominato *hBS*-RNasi A in cui l'*hinge* della RNasi A è stato sostituito interamente con quello della BS-RNasi.

Il lavoro è poi proseguito focalizzando l'attenzione sul residuo 80, che nella BS-RNasi è un'arginina mentre nella RNasi A è una serina. Nella RNasi A esiste un legame a H tra il gruppo ossidrilico della Ser80 e l'ossigeno carbonilico della Ser18. Dati di letteratura mostrano che, quando il residuo in posizione 80 viene sostituito con il corrispondente residuo della BS-RNasi (arginina), l'*hinge* appare molto più disordinato e non presenta interazioni con altri residui (Vatzaki et al., 1999).

Partendo da questi dati sono stati progettati due mutanti della BS-RNasi: nel primo (R80S-BS-RNasi) l'Arg80 è stata sostituita con una Ser; nel secondo (R80S/*hA*-BS-RNasi) la stessa mutazione è stata effettuata sul mutante contenente nel tratto 16-22 la sequenza della RNasi A.

I derivati monomerici delle proteine sono stati espressi, purificati e caratterizzati mediante saggi di attività, dicroismo circolare ed NMR. Tutti i mutanti ottenuti hanno mostrato un corretto folding simile a quello delle proteine *wilde type* e ciò ha consentito lo studio successivo del fenomeno dell'interscambio di domini seguendo due filoni: lo scambio in condizioni fisiologiche e quello in condizioni non fisiologiche.

Un primo risultato interessante è quello ottenuto nello studio dei mutanti in cui sono stati sostituiti i residui di Pro19 e Leu28: la stabilità termica di entrambi i derivati monomerici mutati rimane invariata. Esaminando la tendenza all'interscambio dei dimeri L28Q-BS-RNasi e PALQ-BS-RNasi, essi hanno mostrato una composizione

all'equilibrio tra MxM e M=M di 1/1, offrendo una indicazione della mancanza di un ruolo chiave del residuo di Pro 19.

La sostituzione dell'intero *hinge* della BS-RNasi con quello della RNasi A (mutante *hA*-BS-RNasi) non ha effetti significativi sulla composizione all'equilibrio della miscela MxM/M=M e sulla cinetica di interconversione. La risoluzione delle strutture cristallografiche delle isoforme scambiate di P19A-BS-RNasi e *hA*-BS-RNasi ha mostrato che, a parte piccoli aggiustamenti, le due proteine sono molto simili alla proteina MxM nativa.

Dati NMR hanno mostrato che l'introduzione di una Ser in posizione 80 sposta la conformazione del peptide *hinge* di *hA*-mBS verso quella della RNasi A, con probabile ricostituzione del legame a idrogeno tra Ser80 e Ser18 che ha un ruolo stabilizzante di questa conformazione nella RNasi A. Questo risultato è in accordo con la maggiore stabilità termica del mutante R80S/*hA*-mBS, la cui temperatura di denaturazione è di circa 2°C più alta di quella di R80S-mBS. Per le considerazioni fatte in precedenza si può supporre che questo legame contribuisca anche alla stabilizzazione dell'isoforma M=M del mutante R80S/*hA*-BS-RNasi. Al momento non ci sono dati strutturali sulle due isoforme mutate, ma è possibile ipotizzare che in MxM l' *hinge* sia parzialmente disordinato, poiché nella conformazione necessaria per lo swapping, esso risulta troppo distante per poter formare il legame ad idrogeno, che invece si può formare nella forma non scambiante: questa differenza può pertanto giustificare lo spostamento dell'equilibrio di isomerizzazione verso M=M.

Questi risultati evidenziano che, nell'ambito di una ben definita struttura quaternaria dettata dai due ponti disolfurici intercatena, il fenomeno di scambio dei tratti N-terminali appare essere poco dipendente dalla natura dei residui che compongono il peptide *hinge*, e sorprendentemente più influenzato da una singola mutazione quale la sostituzione in posizione 80 di Arg con Ser piuttosto che da sostituzioni all'interno del peptide cerniera.

Una serie di informazioni aggiuntive sugli effetti della struttura primaria della BS-RNasi sul fenomeno dell'interscambio di domini è stata ottenuta mediante lo studio

di questo fenomeno in condizioni non fisiologiche, cioè ottenendo i dimeri in seguito a liofilizzazione da acido acetico. Lo studio è stato condotto su mBS, sul mutante della BS-RNasi contenente nella regione 16-22 la sequenza della RNasi A (*hBS*-RNasi) e sul suo complementare *hA*-BS-RNasi, cioè il mutante della RNasi A contenente nel tratto 16-22 i residui dell'enzima seminale.

Il primo risultato ottenuto è stato che, contrariamente ai dati riportati in letteratura, anche il derivato monomerico della BS-RNasi con le Cys31 e 32 bloccate con iodoacetammide (IAA) liofilizzato da acido acetico forma una specie dimerica che, in tutte le verifiche effettuate (migrazione elettroforetica in condizioni native, cromatografia a scambio ionico, dissociazione termica), è risultata differente dal dimero non covalente NCD, ottenuto mediante riduzione selettiva e alchilazione della forma MxM della BS-RNasi. Non è escluso quindi che la BS-RNasi possa formare un dimero mediante dislocazione del tratto C-terminale.

Anche il mutante della BS-RNasi contenente l' *hinge* della RNasi A (*hA*-mBS_{IAA}), in seguito alla liofilizzazione da acido acetico, dà luogo a una unica specie dimerica ma non è stato possibile al momento fornire alcuna caratterizzazione strutturale del dimero ottenuto, quindi anche in questo caso non è possibile scartare la possibilità di uno scambio al C-terminale. Per questo mutante, è stata evidenziata una stabilità termica inferiore a quella del dimero ottenuto per liofilizzazione da acido acetico di mBS_{IAA}.

Analizzando invece i risultati ottenuti per il mutante della RNasi A contenente l' *hinge* della BS-RNasi (*hBS*-RNasi A) è stato evidenziato che già la forma monomerica mostra alcune differenze con la proteina d'origine, come una minore migrazione elettroforetica in condizioni native così come succede per il mutante PM8 (Canals et al., 2001), cioè per la variante della ribonucleasi pancreatica umana (HP-RNasi) in cui tutta la coda N-terminale (tratto di catena 1-20) è stata sostituita con quella della BS-RNasi. L'osservazione che invece *hA*-mBS ha una migrazione elettroforetica su gel nativo maggiore di mBS fa pensare che la differente conformazione assunta dai due peptidi cerniera induca modifiche strutturali che

alterano il raggio idrodinamico, che risulta minore quando nella proteina è presente nel tratto 16-22 la sequenza della RNasi A (STSAASS) e maggiore quando la sequenza è quella della BS-RNasi (GNSPSSS). D'altro canto la presenza di una maggiore attività enzimatica ed uno spettro CD lievemente modificato confermano l'ipotesi di modifiche strutturali indotte dall'*hinge*. Invece per *hBS*-RNasi A è stata evidenziata la presenza di numerose specie, tra le quali sono state individuate tre dimeri e almeno un trimero. La caratterizzazione di queste specie ha mostrato tuttavia alcuni dati estremamente promettenti. Dei tre dimeri due sono stati tentativamente identificati come dimeri N e l'altro come dimero C, ma la loro peculiarità è che vengono prodotti in quantità minore rispetto al dN-RNasi A, ma soprattutto hanno una stabilità termica completamente differente tra di loro e a quella del dN-RNasi A. Il primo dimero N-terminale (identificato come PICCO1) mostra sorprendentemente un tempo di dimezzamento di circa 250 ore, mentre il secondo di circa 5 ore. L'ipotesi più plausibile è che il PICCO1 corrisponda ad un dimero N tipo PM8 e che la sua elevata stabilità sia dovuta alla sua capacità di poter formare un interfaccia aperta simile a quella del dN-RNasi A, che tra i possibili dimeri non covalenti delle due ribonucleasi è sicuramente quella che forma un maggiore numero di legami a H tra le due subunità, ma in più ha la possibilità di bloccare le due Pro19 tra le catene laterali di Gln101 e Tyr25, aumentando enormemente le interazioni tra le due subunità.

In conclusione tutti i dati raccolti in questo lavoro di tesi, alcuni dei quali ancora da confermare mediante indagini strutturali, indicano che la sostituzione dei residui del peptide cerniera nella BS-RNasi non alterano, in condizioni fisiologiche, la sua propensione allo scambio, controllata invece da residui esterni a questa regione come la Leu28 e l' Arg80. D'altro canto lo studio del *domain swapping* in condizioni non fisiologiche ha messo in evidenza che sostituendo i residui dell' *hinge* della BS-RNasi con quelli della RNasi A, sia il dimero non covalente ottenuto per riduzione dei ponti disolfurici intersubunità di MxM sia quello ottenuto per liofilizzazione da acido acetico, mostrano una minore stabilità agli esperimenti di dissociazione

termica. Sostituendo invece l' *hinge* della RNasi A con i residui della BS-RNasi è possibile ottenere un dimero che ha una stabilità termica molto più alta dei dimeri formati dalla RNasi A. Il ruolo di queste mutazioni sembrerebbe essere quindi non solo quello di favorire la struttura quaternaria del dimero non covalente della BS-RNasi (NCD), cioè il dimero senza i ponti disolfurici, in grado di sfuggire all'inibitore di ribonucleasi e considerato responsabile dell'attività antitumorale dell'enzima, ma anche sfavorire una struttura simile sia a quella del dN-RNasi A sia a PM8, che anche se termicamente più stabili non sono in grado di sfuggire all'inibitore citosolico e quindi privi di quelle proprietà biologiche speciali peculiari della BS-RNasi.

ABSTRACT

Domain swapping is a mechanism for two or more protein molecules to form dimers or higher oligomers by exchanging identical structural elements (Schlunegger et al., 1997). More than 50 crystal structures of domain-swapped proteins have been deposited in PDB. Sequence comparison shows the lack of sequence similarity among these domains. No specific sequence motif can be found among these domains. Therefore, based on its sequence, a protein cannot be predicted to be domain swapped or not. The possible physiological significance of this phenomenon is still unclear (Rousseau et al., 2003). It has been proposed that a large number of proteins may undergo this process under physiological or pathological conditions, thus it could represent a mechanism to regulate function, or even an evolutionary strategy to increase protein complexity.

The bovine seminal ribonuclease (BS-RNase) offered the first X-ray structure of a protein showing the interchange of N-terminal regions between the two polypeptide chains (Mazzarella et al., 1993). BS-RNase, the only oligomeric protein in the family of ribonucleases, is a dimer whose subunits are homologous (80% identity) to bovine pancreatic ribonuclease (RNase A), prototype of the "pancreatic-like" ribonucleases family. Seminal enzyme is different from the RNase A, as it is endowed with a multiplicity of biological actions: it can degrade double-stranded RNA and it has a strong antitumor action (D'Alessio et al., 1997). BS-RNase is a homodimer, maintained by two intersubunit disulfide bonds as well as by noncovalent interactions. The two subunits can associate to form two different tertiary structures: in the first one, the two subunits exchange their N-terminal helices (MxM); in the other form (M=M) there is no exchange of parts between subunits, and each protomer folds on to itself. In the native protein the two isoforms reach a 2/1 equilibrium, so that the structural characterization in solution is more difficult to realize.

The swapping of N-terminal arms has relevant biological implications: the cytotoxic action is a peculiar property of MxM. In the reducing environment of cytosol, M=M dissociates into monomers, which are strongly inhibited by RI, whereas MxM

remains as a non-covalent dimer (NCD), which evades RI. Model building of the complexes between NCD and RI reveals that it is the only dimer equipped with a quaternary organization capable to interfere seriously with the binding of the inhibitor (Sica et al., 2004).

One advance in understanding 3D domain swapping is that more than one domain in a protein can swap. It was shown that both N- and C-termini swap in RNase A dimers. RNase A forms a dimer during lyophilization in acetic acid (Crestfield et al., 1962). Further studies showed that there are two types of dimers of RNase A: a minor fraction of the dimers is swapped at the N-terminus, whereas a major fraction is swapped at the C-terminus (Gotte et al., 1999; Liu et al., 1998; Liu et al., 2001).

NMR data obtained on mBS (Avitabile et al., 2003) and literature data (Sica et al., 2003) show that the most flexible region of the protein is the hinge peptide (residues 16-22), which shows the highest sequence difference with RNase A. This finding suggests a possible driving role of this region in the swapping process, also supported by the general observation that manipulation of the hinge loop affects substantially the swapping propensity of the proteins (Rousseau et al., 2003).

In order to clarify the actual role played by the hinge and interface regions in the swapping process through a systematic mutagenesis approach, we have prepared four variants by substituting the crucial residues in inducing dimerization and swapping of N-terminal arms of the BS-RNase with the corresponding residues of RNase A: P19A-BS-RNase, L28Q-BS-RNase, P19A/L28Q-BS-RNase (called PALQ-BS-RNase) and G16S/N17T/P19A/S20A-BS-RNase (called *hA*-BS-RNase).

We have then decided to investigate the structural basis of the swapping process in BS-RNase focusing the attention on residues that interacts with the hinge loop and in particular we focus one's attention on the arginine 80 that in BS-RNase interact, through an hydrogen bond, with the glicine 16 of the other subunit so the swapped dimer became stable. In RNase A the hinge loop 16-22 is well ordered both at solid state (Berisio et al., 2002) and in solution (Santoro et al., 1993). The side-chain of Ser80 makes an hydrogen bond with the backbone oxygen of Ser18. The variant of

RNase A with an arginine in position 80 disrupts this interaction and presents a greater mobility of the hinge residues (Vatzaky, 1999). To investigate the role, in the swapping, of the residue 80 we expressed two variants in which there is the point mutation of the arginine 80 with a serine but in one this substitution is introduced in the plasmid containing the residues of BS-RNase in the sequence 16-22 (R80S-BS-RNase), while in the other variant the same residue is introduced in the plasmid with the sequence of RNase A in the peptide hinge (R80S/*hA*-BS-RNase).

All the proteins were expressed in *Escherichia coli* and the first products of the purification procedure were about 20 mg/L of recombinant variants in monomeric form, with cysteines 31 and 32 linked to two glutathione molecules. Each of these variants retains a catalytic activity against yeast RNA comparable with that of parent mBS, indicating that a native conformation is present. A further indication of the similarity of their global fold to that of the parent protein is provided by the 1D ¹H-NMR spectra, which display all the characteristic signals in almost identical positions. The similarity is confirmed also by CD measurements. The estimation of secondary structure content, performed by the neural network-based procedure implemented in the program K2D (Andrade et al., 1993; Lobley et al., 2002) yielded very similar values for all the protein samples (28% α -helix, 36% β -sheet and 40% random coil); these values are also in good agreement with the secondary structure derived from the NMR structure of mBS (Avitabile et al., 2003).

The thermal stability of the mutant proteins was monitored by CD spectroscopy. The values of T_m , calculated by linear regression analysis of the experimental data, indicate that in general the mutants display only a very small difference with respect to the parent form ($T_m=53^\circ\text{C}$). On the other hand, the T_m of P19A-mBS (55°C) is 6°C lower than that of RNase A; the difference is even higher in the *hA*-mBS and PALQ-mBS ($T_m = 53.5^\circ\text{C}$) that display the same thermal stability of the parent protein. In contrast the substitution of Arg 80 by Ser in the mutants R80S-mBS and R80S/*hA*-mBS decreases by a significant amount their thermal stability with respect to the parent proteins. The comparison of the thermal stability of the two mutants

suggests that the presence of a serine residue at position 80 in combination with the hinge loop of RNase A leads to a specific interaction reconstitution of the same hydrogen bond between the oxydriol of Ser 80 and the backbone oxygen of Ser 18 observed in RNase A, which increases the thermal stability by about 2 °C.

To allow a more accurate evaluation of the effect of single point mutations on the solution structure of monomeric derivatives we analysed the 2D-NMR spectra of the different variants of mBS. Apart from the expected differences, the high similarity among the spectra of the variants and the parent protein provides an additional, strong evidence of an essentially identical fold of all variant proteins.

The local conformational of the hinge residues was explored by comparing the backbone chemical shifts of R80S/*hA*-mBS with those previously reported of mBS and RNase A (Avitabile, 2003). The analysis of the spectra demonstrates that the resonances of the R80S/*hA*-mBS mutant are shifted in positions almost superimposed to those of RNase A, indicating that the chemical environment of the hinge peptide is very similar in the two proteins.

To directly characterise the process of exchange of the N-terminal ends, we prepared dimers of all variants. The monomeric proteins were submitted to mild reduction, which selectively removes the glutathione molecules linked to cysteines 31 and 32, followed by air oxidation and gel-filtration to obtain the corresponding dimers. We obtained 80% for all the dimers, whereas in the case of L28Q and P19A/L28Q variants the yield of dimer was significantly lower, about 50%. The recombinant dimers, obtained predominantly in their non-swapped forms, were incubated at 37 °C for a week, to allow equilibration between the interconverting forms. The swapping tendency of the dimeric proteins were then evaluated by two independent methods. In the first method based on the higher reactivity of the inter-chain disulfide bridges with respect to the intra-chain ones (Piccoli et al., 1992) we can deduce the relative amount of each isoform by integrating the peaks corresponding to the monomer (for M=M) and to the dimer (for MxM) respectively, after selective reduction of the interchain disulfide bridges. Another method to evaluate the extent of swapping in the

equilibrium mixtures was assessed by cross-linking experiments with divinyl sulfone (DVS), followed by SDS-PAGE analysis under reducing conditions (Ciglic et al., 1998). DVS joins covalently the two histidines of the active site (His 12 and His 119), which belong to the same subunit in M=M and to different subunits in MxM. Thus, upon reduction and denaturation, either a product of mass 27,000 (from MxM), or a product of mass 13,500 (from M=M) is obtained.

We observed that at 37 °C the dislocation of the N-terminal arms for the recombinant BS-RNase is very similar to that reported for the native enzyme (Piccoli et al., 1992), reaching the same 70:30 equilibrium in about five days. The kinetics of the N-terminal arms swapping and the amount of MxM form at plateau in P19A-BS-RNase, *hA*-BS-RNase and R80S-BS-RNase is comparable to that of BS-RNase. By contrast substitution of Leu 28 with Gln affects in a significant way the kinetics and the equilibrium of swapping in both L28Q-BS-RNase and PALQ-BS-RNase variants. Furthermore, the plateau corresponds to 50 % of MxM for both proteins. The presence of Leu 28 in BS-RNase seems to favour not only the interaction between the subunits, but even for the swapping process. Interestingly, literature data for some variants of RNase A also report a higher yield of dimer when Gln 28 is substituted with Leu (Ciglic et al., 1998).

For the R80S/*hA*-BS-RNase mutant the dislocation of N-terminal arms was decreased by a significant amount, the swapped form representing only 30% of the equilibrium mixture and the results are in accordance with the DVS cross-linking results.

As expected, at 4°C the interconversion was obviously slowed down, in agreement with the results reported by Piccoli et al. (1992) on the native protein: to assess this hypothesis, we monitored the reverse process, namely the interconversion of MxM into M=M, for P19A-BS-RNase and *hA*-BS-RNase. The mutant behaves like the native sample (Piccoli et al., 1992), reaching the typical equilibrium mixture in about 180 hours at 37 °C, whereas at 4 °C the process seems kinetically frozen, and the content of MxM is constant over several weeks.

The X-ray data show that the MxM form of the two variants (P19A-BS-RNase and *hA*-BS-RNase), apart from few minor adjustments, is very similar to that of native MxM. Although no X-ray data are available for the M=M forms of the mutants, NMR data of their monomeric derivatives indicate a high flexibility of the 16-22 region. It seems also reasonable to assume that the same disorder characterizes the unswapped form of both dimers, where each subunit shares the global fold of the monomeric derivatives. Therefore it is reasonable to conclude that the substitutions increase the flexibility of the swapped hinge peptide, thus reducing the entropy loss which accompanies the transformation from M=M to MxM of the parent protein. On the other hand the loss in the MxM form of the mutant of good contacts between the hinge peptide and the protein matrix, and in particular of the stabilizing interactions of the proline side chain within the cavity formed by the side chains of Tyr25 and Gln101, also reduces the enthalpic gain in the same transformation, which somewhat counterbalances the entropic effects. Thus the insensitivity of the swapping equilibrium to the substitutions is the result of a subtle balance of enthalpic and entropic effects.

Overall, the experimental data obtained indicate that neither the conformational state and the swapping propensity are directed by the hinge sequence, since the substitution of Ser80 is both necessary and sufficient to switch on the swapping of N-terminal arms. It is logical to assume that the same H-bond stabilizes the unswapped conformation of the dimeric form and, consequently, in R80S/*hA*-BS-RNase the conformational equilibrium is shifted toward the M=M side. As far as the swapped form is concerned, at moment we have no structural data, however we can speculate that the hinge loop is reasonably disordered, as in the case of the *hA*-BS-RNase mutant, since the side-chain of Ser80 is too short to make any interaction with residues belonging to the other subunit. In this hypothesis, the entropy should favour the swapped form, that for this reason still represents the 30 % of the equilibrium mixture.

Preliminary experiments to compare the stability of non covalent dimers of BS-RNase and *hA*-BS-RNase indicate that at 37 °C the dissociation rate of the first is higher: the $t_{1/2}$ of the form derived from the parent enzyme (5 hours) is, i.e. about twice that of the form derived from *hA*-BS-RNase variant (2.5 hours). This data suggests a hypothetical evolutionary path from RNase A to BS-RNase, pointing directly to a possible role for the hinge sequence, designed to stabilize the structure of the non-covalent dimer.

To better define the role of hinge peptide we studied the swapping in non physiological conditions for the two mutants *hBS*-RNase A and *hA*-BS-RNase. The parent mBS and the mutant *hA*-mBS lyophilized in acetic acid evidenced the formation of a dimeric species that, in all the tests (native-Page, ionic exchange chromatography, thermal dissociation) turned out to be different from non covalent dimer (NCD). It can be proposed that BS-RNase can form a dimer by exchanging the C-terminal region. It has not been possible by now to perform any kind of structural characterization of the dimer, anyway experiments evidence indicate that the thermal dissociation of the dimer obtained for *hA*-mBS is lowest. These data seem to confirm that, in the evolution from the RNase A to the BS-RNase, the mutations introduced in the region 16-22 stabilize or favor the structure of the BS-RNase in reducing conditions (NCD). The analysis of the mutant of RNase A with the hinge sequence of the BS-RNase (*hBS*-RNase A) gave other clues to this hypothesis.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1. Domain swapping

Fin dalla scoperta dell'esistenza di molecole proteiche composte da due o più catene polipeptidiche sono stati fatti molti sforzi per la comprensione e lo studio della loro regolazione metabolica (Monod et al. 1965; Koshland et al., 1966) e del loro assemblaggio e disassemblaggio (Kikuchi & King, 1975; Caspar, 1980; Jaenicke, 1995).

Molte proteine sono evolute da una forma monomerica ad una oligomerica e ciò ha portato loro una serie di vantaggi, come la possibilità di avere una maggiore concentrazione locale dei siti di catalitici, un controllo allosterico dell'attività enzimatica, una maggiore superficie di legame, nuovi siti attivi all'interfaccia e l'acquisizione di proprietà biologiche assenti nei rispettivi monomeri (Liu and Heisenberg, 2002).

Sono stati proposti diversi meccanismi che potessero spiegare l'evoluzione delle proteine oligomeriche a partire dai corrispettivi monomeri, ed uno di questi è il *3D domain swapping* (Bennet et al., 1995). Con tale termine si intende un fenomeno che prevede la dislocazione di un dominio (in alcuni casi uno o più elementi strutturali) di un monomero nel corpo di un'altra subunità monomerica identica, in cui va ad occupare il posto del corrispondente tratto di catena polipeptidica. Se il monomero che adotta la “conformazione chiusa” e il dimero che adotta la “conformazione scambiata” esistono in una forma stabile, la proteina può essere considerata un buon esempio di *3D domain swapping*.

In tutte le proteine che presentano il fenomeno del *domain swapping* possono essere individuate tre regioni caratteristiche:

- **peptide cerniera** (o “*hinge loop*”): segmento della catena polipeptidica che connette il dominio scambiato al corpo della proteina;

- **interfaccia chiusa**, presente sia nel monomero sia nell'oligomero: nel primo caso è la regione di contatto tra i due domini della stessa subunità monomerica mentre nel secondo è quella che si forma tra il dominio di un monomero e il dominio scambiato dell'altro monomero;
- **interfaccia aperta**, presente solo nell'oligomero: è la regione di interazione di due subunità monomeriche che si scambiano i domini.

Un dimero 3D domain swapped, può quindi essere definito come un dimero che ha le interfacce chiuse formate tra due differenti subunità (monomeri aperti).

In figura 1.1. è mostrata una rappresentazione schematica del “domain swapping”.

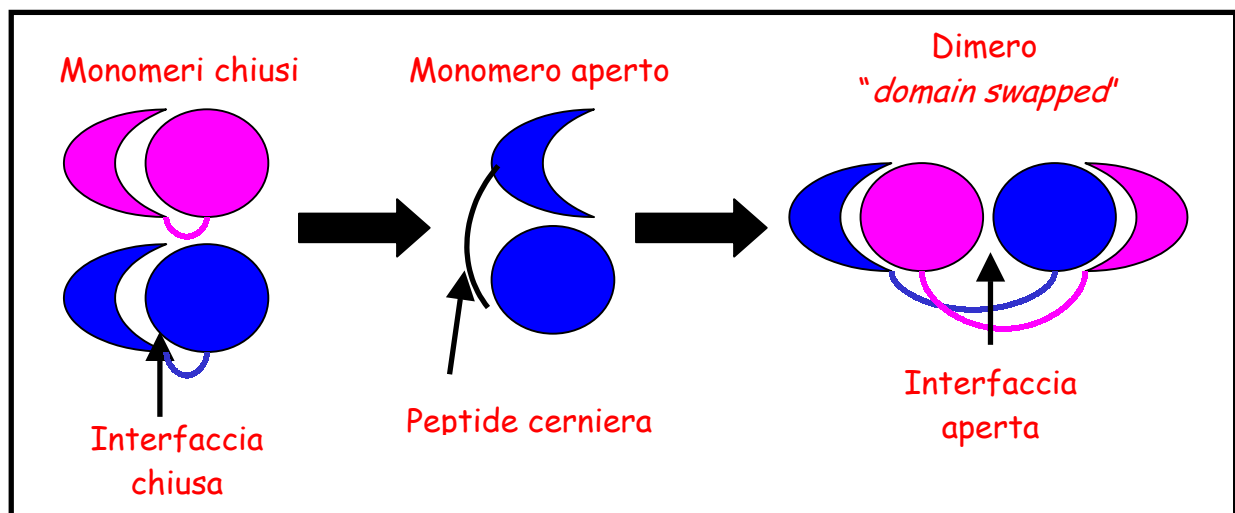


Figura 1.1.: Rappresentazione schematica del “domain swapping” (Schlunegger et al., 1997).

In Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/) sono state finora depositate oltre 50 strutture di proteine caratterizzate dal fenomeno del *domain swapping* e da un'analisi di queste è emerso che sebbene i domini interessati siano, nella maggioranza dei casi, N- o C-terminali, non vi è alcuna limitazione in merito in quanto in qualche caso è stato osservato lo scambio di una regione centrale della proteina. E' inoltre possibile addirittura lo scambio di entrambe le regioni N- e C- terminale (Liu et al., 2002). Il dominio scambiante può essere un intero dominio globulare, un singolo elemento di struttura secondaria (un' α -elica, un β -strand) o un insieme di strutture secondarie. In

tabella 1.1. sono riportate le caratteristiche di alcune proteine che presentano il fenomeno del *domain swapping*.

Tabella 1.1.: Proprietà e funzione di alcune proteine che danno luogo al fenomeno del *domain swapping*.

PROTEINA	PDB code	Funzione	Dominio dislocato
BS-RNasi (1993)	1BSR	Ribonucleasi	Elica N-terminale
DT <i>dimero</i> (1994)	1DDT	Legame recettore	Dominio globulare C-terminale
OBP <i>dimero</i> (1996)	1OBP	Odorant binding	Elica e strand C-terminale
Suc1 <i>dimero</i> (1996)	1PUC	Reg. ciclo cellul.	β -strand C-terminale
Fattore IX/X (1997)	1IXX	Anticoagulante	Loop centrale
RNasi A (<i>dimero</i> N-Terminale)	1A2W	Ribonucleasi	Elica N-terminale
Barnase <i>trimero</i> (1999)	1YVS	Ribonucleasi	Elica N-terminale
Cyanovirin-N <i>dimero</i> (1999)	3EZM	-----	Dominio globulare N- o C-terminale
RNase A (<i>dimero</i> C-Terminale)	1FOV	Ribonucleasi	β -strand C-terminale
Prione umano <i>dimero</i> (2001)	1I4M	-----	Elica C-terminale
RNasi A (<i>trimero</i> ciclico C-terminale) (2002)	1JSO	Ribonucleasi	β -strand C-terminale
Sulerythrin <i>dimero</i> (2003)	1J30	Trasportatore di elettroni	β -turns e elica N-terminale
Stefin A <i>dimero</i> (2003)	1N9J	Inibitore di idrolasi	Tratto esteso e elica N-terminale
Ketopantoate Idrossimetil transferasi <i>decamero</i> (2003)	1OY0	Transferasi	Elica N-o C-terminale
Allergene Che A 3 <i>tetramero</i> (2003)	1PMZ	Allergene	Elica C-terminale
Repressore del sistema trascrizionale <i>dimero</i> (2004)	1U8S	Trascrizione	Strand e elica C-terminale
Rhodocetin <i>dimero</i> (2004)	1SB2	Tossina	Loop centrale
SCAN <i>dimero</i> (2005)	1Y7Q	Trascrizione	Elica N-terminale

L'interesse addizionale nello studio del 3D *domain swapping* è dovuto alla possibilità di poter collegare questo processo a un meccanismo di oligomerizzazione patologica,

come nel caso della formazione di fibrille amiloidi (Klafki, W.H., *et al.* 1993). Queste ultime presentano caratteristiche simili alle proteine che danno luogo al fenomeno dello *swapping*: in entrambi i casi, infatti, l'interazione tra le subunità è altamente specifica, i monomeri possono formare aggregati lineari e le isoforme isolate risultano stabili. Inoltre, in entrambi i casi, è stata proposta la possibilità che le proteine possano oligomerizzare, se si trovano ad alte concentrazioni e in condizioni destabilizzanti (Liu, Y., *et al.*, 2001).

Un modello di *domain swapping* è stato proposto per il meccanismo di propagazione della proteina prionica umana (Lee and Eisenberg, 2003) la cui conversione monomero-dimero è stata associata ad una forma di encefalopatia spongiforme. La proteina prionica umana (Knaus et al., 2001) è una proteina cellulare monomerica che forma un dimero attraverso lo scambio dell'elica 3 all'estremità C-terminale. Nella forma monomerica il dominio C-terminale è legato al resto della catena polipeptidica attraverso il ponte disolfurico Cys32-Cys79. La risoluzione della struttura cristallografica ha tuttavia evidenziato che allo stato solido la proteina è un dimero che presenta l'interscambio dell'elica 3 fra le due subunità. Questo processo richiede la rottura del legame intercatena tra i due residui di cisteina, che nel dimero viene riformato tra cisteine appartenenti a catene diverse. E' stato inoltre dimostrato che *in vitro* la proteina prionica ricombinante attraverso la formazione di ponti disolfurici intermolecolari è in grado di dar luogo a un processo di oligomerizzazione reversibile, modulato dall'aggiunta di sostanze riducenti.

Non è possibile stabilire tra le proteine che danno luogo al fenomeno del *domain swapping* delle analogie di funzioni, dimensioni o sequenze, e ciò impedisce, nota una proteina e la sua sequenza, stabilire a priori se questa scambierà un dominio o meno.

1.1.1. Meccanismo

Le interazioni esistenti all'interfaccia chiusa di un monomero contribuiscono all'energia richiesta per l'apertura dell'interfaccia chiusa durante lo *swapping*. Questa

energia è chiamata energia di attivazione del 3D *domain swapping* ed è diversa da proteina a proteina.

Un meccanismo proposto per spiegare il fenomeno del *domain swapping* prevede che in determinate condizioni l'interfaccia chiusa nel monomero si apra portando alla formazione di un monomero aperto. L'elevata differenza energetica tra il monomero chiuso e quello aperto rappresenta l'energia di attivazione. Quando due o più monomeri aperti si avvicinano con l'orientazione giusta si forma l'oligomero scambiato. La differenza di energia libera tra il monomero chiuso e l'oligomero scambiato è bassa, dato che l'unica differenza strutturale è legata alla conformazione del peptide cerniera e dell'interfaccia aperta. L'alta energia di attivazione esistente tra il monomero chiuso e l'oligomero scambiato può essere ridotta mediante variazioni delle condizioni in soluzione.

Recenti studi hanno mostrato che esistono tre fattori che influenzano la differenza di energia libera tra il monomero e l'oligomero scambiato:

1. la maggiore entropia del monomero che fornisce un contributo favorevole alla sua stabilità;
2. il peptide cerniera può formare nuove interazioni nell'oligomero scambiato che alterano la conformazione tridimensionale della regione modificandone i parametri geometrici. Lo scambio può quindi aumentare o diminuire la tensione contribuendo alla variazione di energia libera;
3. nuove interazioni all'interfaccia aperta che forniscono al dimero scambiato un contributo favorevole alla sua stabilità (Liu and Eisenberg, 2002).

L'introduzione di mutazioni nella regione cerniera, all'interfaccia aperta o in quelle regioni che interagiscono con l' *hinge* possono cambiare il rapporto tra monomero e oligomero scambiato.

Studi di mutagenesi effettuati recentemente sulla proteina NF-kappaB p50, che è un dimero non covalente del tipo "side-by-side", appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione negli eucarioti, hanno messo in evidenza che specifiche mutazioni all'interfaccia tra le subunità sono in grado di consentire la formazione di un dimero

scambiato. Nonostante l'interscambio di un dominio, la proteina mutata, preserva non solo la struttura quaternaria della proteina nativa, ma anche la sua funzione biologica. Lo studio di questo particolare caso ha consentito la formulazione di una nuova ipotesi sul significato biologico del *domain swapping* (Bennett & Eisenberg, 2004): questo meccanismo potrebbe essere stato utilizzato in modo transiente nel corso dell'evoluzione di una proteina per acquisire una struttura quaternaria vicina a quella definitiva, anche se attualmente la proteina non presenta domini scambiati.

1.1.2. *Domain swapping* nelle ribonucleasi

Due membri della superfamiglia delle ribonucleasi forniscono dei modelli di particolare interesse per lo studio del fenomeno dello scambio di domini per la contemporanea presenza del prototipo monomero, la ribonucleasi pancreatica bovina (RNasi A), e la controparte dimerica naturale, la ribonucleasi seminale bovina (BS-RNasi).

Va ricordato che nonostante il concetto di *domain swapping* sia relativamente recente in realtà il fenomeno è stato ipotizzato per la prima volta più di 40 anni fa proprio nel caso della ribonucleasi pancreatica bovina (RNasi A), quando fu ritrovato che la proteina liofilizzata da acido acetico al 40 % formava almeno un dimero e altri oligomeri (Crestfield et al. 1962).

Il dimero ottenuto rimaneva attivo con la stessa specifica attività del monomero. Da esperimenti di modifica chimica effettuati sui residui del sito attivo fu anche proposto che il dimero ottenuto fosse dovuto allo scambio dell'elica N-terminale. Studi biochimici più approfonditi hanno poi evidenziato la presenza di due dimeri diversi, uno in quantità maggiore rispetto all'altro, caratterizzati da un differente tempo di ritenzione su gel-filtrazione, e differente migrazione su elettroforesi in condizione nativa (Gotte *et al.* 1998).

La risoluzione delle strutture cristallografiche dei due dimeri ha mostrato che in uno è presente la dislocazione dell' α -elica N-terminale di una subunità nel corpo dell'altra, e viceversa, (Liu, Y., *et al.* 1998), mentre nell'altra il dimero mostra la dislocazione

dei β -strands C-terminali (Liu, Y., *et al.* 2001) ed è stato inoltre reso noto che il primo è presente in quantità minori rispetto al secondo (Sorrentino et al., 2000).

Ciò che rende ancora oggi interessante lo studio di quest'enzima è la possibilità di scambiare entrambe le estremità N- e C-terminali (Liu, Y., *et al.* 2002). Tutti gli oligomeri ottenuti per liofilizzazione da acido acetico della RNasi A hanno siti catalitici misti e sono cataliticamente attivi su RNA. L'attività dei due dimeri è simile tra di loro ed è circa il 50% di quella del monomero della RNasi A (Libonati & Gotte, 2004).

L'unico membro appartenente alla superfamiglia delle ribonucleasi esistente sotto forma di dimero in condizioni fisiologiche è la ribonucleasi seminale bovina (BS-RNasi) che rappresenta un ottimo modello per lo studio del *domain swapping*. La BS-RNasi è un omodimero, in cui le due subunità sono tenute insieme da due ponti disolfurici intercatena, che dà luogo a due isoforme dotate di diversa struttura terziaria in equilibrio. In una la coda N-terminale (residui 1-15) di ciascuna catena polipeptidica interagisce con il corpo (23-124) dell'altra subunità (MxM, o dimero scambiato), nell'altra tale scambio non avviene e il segmento N-terminale interagisce con il corpo della propria subunità (M=M, o dimero non scambiato). In soluzione le due isoforme si interconvertono rapidamente tra di loro per raggiungere un equilibrio di 2/1 tra MxM e M=M (Piccoli *et al.*, 1992). L'unicità del caso della BS-RNasi, rispetto a tutti gli altri presi in considerazione, consiste nel fatto che il fenomeno dell'interscambio di domini non prevede una conversione monomero-dimero ma un equilibrio tra due forme dimeriche. La presenza dei ponti disolfurici intercatena fa perdere l'extra grado di libertà conformazionale aggiuntivo che favorisce le forme dimeriche nell'equilibrio monomero-dimero e permette, di conseguenza, di estrapolare i contributi di specifici residui nel *domain swapping*.

Lo scambio dell'elica N-terminale è stato osservato anche nella struttura cristallografica di un mutante della ribonucleasi pancreatica umana (chiamato PM8), in cui i residui 1-22 e il residuo 101 sono stati sostituiti con i corrispondenti residui della BS-RNasi (Canals et al., 2001). La prima differenza osservata è che per questo

mutante non è stata necessaria la liofilizzazione da acido acetico per favorire la dimerizzazione, i cristalli sono stati ottenuti senza alcun trattamento preliminare del campione. Sorprendentemente è stato osservato che nonostante la coda N-terminale sia la stessa della BS-RNasi il dimero scambiato di PM8 mostra una struttura quaternaria completamente differente rispetto a quello dell'enzima seminale. Entrambi i siti attivi di PM8 sono potenzialmente funzionanti anche se la capacità di scindere l'RNA non può essere confermata in quanto la popolazione monomerica presente in soluzione è elevata e difficile da separare e non consente un'analisi approfondita delle proprietà catalitiche. In ogni caso questa proteina non è in grado di sfuggire all'inibitore citosolico di proteasi (Canals et al., 2001).

1.2. Studi strutturali

1.2.1. RNasi A

La RNasi A è un enzima di 124 residui amminoacidici che catalizza l'idrolisi di acidi ribonucleici con specificità per i legami fosfodiesterici che presentano basi pirimidiniche all'estremità 3'. Questo enzima è stato oggetto di studi pionieristici sulla rinaturazione spontanea delle proteine (Sela et al., 1957) e sulla loro sintesi (Hirs et al., 1960); è stato uno dei primi enzimi di cui è stata determinata la sequenza amminoacidica (Hirs et al., 1960, Smyth et al., 1963) e di cui è stata determinata la struttura tridimensionale mediante cristallografia ai raggi X (Kathuria et al., 1967, Wyckoff et al., 1967): la prima struttura cristallografica, con una risoluzione di 2 Å, è stata eseguita già 50 anni fa e sulla banca dati Protein Data Bank (PDB) sono depositate oltre 100 strutture (www.pdb.bnl.gov).

Allo stato solido la struttura tridimensionale della RNasi A mostra che gli elementi di struttura secondaria predominanti sono: due β -sheets, uno costituito da quattro tratti di β -strands antiparalleli (residui 61-63, 72-74, 106-111 e 116-123) e l'altro formato da tre tratti di β -strands antiparalleli (residui 43-47, 79-86 e 97-104); tre tratti brevi di

α -elica (residui 4-12, 25-32 e 51-55) e un tratto di elica 3_{10} (residui 56-59) (Berisio *et al.* 2002).

Lungo la catena polipeptidica sono presenti otto residui di cisteina tutti coinvolti nella formazione di quattro ponti disolfurici: Cys26-Cys84, Cys58-Cys110, Cys40-Cys95 e Cys65-Cys72. I primi due ponti disolfurici legano un β -strand con un' α -elica, mentre gli altri due collegano residui che si trovano su due loops. Questi quattro legami covalenti sono fondamentali per la stabilità dell' enzima nativo (Layti *et al.*, 1993; Shimotakahara *et al.*, 1997; Klink *et al.*, 2000).

Lungo la catena polipeptidica sono inoltre presenti quattro residui di prolina anch'essi critici per il corretto ripiegamento della proteina: Pro42, Pro93, Pro114 e Pro117. I legami peptidici che coinvolgono il residuo Pro42 e Pro117 sono in *trans*, invece quelli che coinvolgono i residui di Pro93 e Pro114 sono in *cis*.

Come ricordato nel paragrafo precedente, in seguito a incubazione in presenza di agenti denaturanti seguita da liofilizzazione sono stati isolati due diversi dimeri e oligomeri di ordine superiore, che differiscono non solo per i tratti di catena polipeptidica coinvolti dal fenomeno del *domain swapping* ma anche per l' intorno chimico circa i tratti di catena dislocati. Le strutture dei due dimeri e di un trimero sono state risolte e verranno presentate in dettaglio nei prossimi paragrafi, mentre per gli altri oligomeri sono disponibili soltanto dei modelli.

1.2.2. Dimero N della RNasi A

Nel dimero N-terminale della RNasi A (dN-RNasi A) la regione 1-15 di una subunità viene dislocata nel corpo (regione 23-124) dell' altra subunità, e viceversa, con formazione di una interfaccia aperta tra il tratto di β -strand 97-103 di una subunità e il corrispettivo dell' altra. Lo scambio dell'elica N-terminale non distrugge i siti catalitici (costituiti dai residui His 12, Lys 41 e His 119) che però risultano essere misti, costituiti cioè da residui appartenenti alle due subunità: ciò è in accordo con il dato che il dimero conserva l'attività enzimatica del monomero (Crestfield *et al.*, 1962).

La struttura terziaria di ciascuna subunità monomerica resta inalterata in seguito al fenomeno del *domain swapping*, ad eccezione della regione 16-22 che non solo assume una struttura diversa da quella del monomero, ma addirittura differisce nelle due subunità: in un caso risulta avere una conformazione elicoidale e nell' altro invece una conformazione estesa (Liu et al., 1998).

La sovrapposizione delle strutture mostra che l' "unità funzionale" della RNasi A e della BS-RNasi hanno essenzialmente la stessa conformazione. I due dimeri infatti mostrano la stessa interfaccia chiusa garantendo la corretta posizione delle due istidine del sito attivo. L' interfaccia aperta è tuttavia completamente differente: nel dN-RNasi A è costituita dai due β -strand antiparalleli (residui 97-103 e residui 297-303) con sei legami a idrogeno tra i due strands, mentre nella BS-RNasi è costituita da 2 α -eliche (residui 24-33) tenute insieme da due ponti disolfurici. Una ulteriore differenza è rappresentata dalla formazione di interazioni di natura idrofobica tra le catene laterali della Leu28 e dall'assenza di legami a idrogeno tra le due eliche.

La regione cerniera della RNasi A (con sequenza STSAASS) ha una differente conformazione di quella della BS-RNasi (con sequenza GNSPSSS) che forma un turn in corrispondenza della Pro 19. Nella RNasi A il residuo 19 è una Ala che conferisce alla regione una maggiore flessibilità. La maggiore flessibilità dell' *hinge* e l'assenza dei ponti disolfurici tra le due subunità consente al dN-RNasi A di formare 6 legami a idrogeno all'interfaccia aperta, realizzando un beta-sheet costituito da 6 strand che si estendono su entrambe le subunità del dimero. Questo crea una relazione asimmetrica tra le due subunità che si riflette nel peptide *hinge*: uno infatti assume una conformazione elicoidale, l'altro una estesa.

In entrambi i dimeri le forze di adesione delle subunità sono dovute allo scambio ma nel dN-RNasi A si osserva una maggiore energia di legame dovuta ai nuovi sei legami a idrogeno formati all'interfaccia aperta.

La presenza, nel dN-RNasi A e nella BS-RNasi, di una stessa interfaccia chiusa ma differente interfaccia aperta suggerisce che lo scambio di domini è sufficiente alle

proteine per formare oligomeri, ma la precisa orientazione delle subunità è influenzata dalle interazioni all'interfaccia aperta.

1.2.3. Dimero C della RNasi A

Il dimero maggiore della RNasi A (quello che si ottiene in quantità maggiore in seguito alla liofilizzazione) formato dallo scambio del β -strand C-terminale ha messo in luce per la prima volta la possibilità che una proteina sia in grado di scambiare due diversi domini.

Nel dimero C-terminale (dC-RNasi A) si ha dislocazione dei β -strands corrispondenti alla regione 116-124, mentre l' interfaccia aperta, formata tra le due regioni cerniera, non risulta strutturata. Ciascuno strand dell' "hinge loop" (residui 112-115) contiene inoltre un residuo di asparagina (Asn113) che può formare tre legami idrogeno (Liu et al., 2001). Lo scambio in questo dimero è mediato dal peptide cerniera 111-115 contenente un residuo di prolina in posizione 114 che passa da una conformazione cis ad una trans nella trasformazione monomero-dimero.

Le strutture cristallografiche della RNasi A e dei due dimeri ottenuti attraverso la liofilizzazione da acido acetico sono riportate in figura 1.2.

1.2.4. PM8/HP-RNasi

La struttura cristallografica del dimero di PM8 (Canals et al., 2001) mostra che i due peptidi cerniera sono identici tra di loro ma differenti da quelli della BS-RNasi: adottano infatti una conformazione a elica 3_{10} stabilizzata dalla formazione di una serie di legami a idrogeno tra residui dei due peptidi *hinge*. Una conformazione elicoidale del peptide cerniera è stata osservata solo nel dN-RNasi A. L'interfaccia chiusa non mostra significative differenze rispetto ai due dimeri della RNasi A e alla BS-RNasi, mentre sono invece sostanziali le differenze all'interfaccia aperta che assomiglia a quella del dN-RNasi A (residui 97-104) anche se la natura delle interazioni che mantiene la struttura quaternaria è completamente differente.

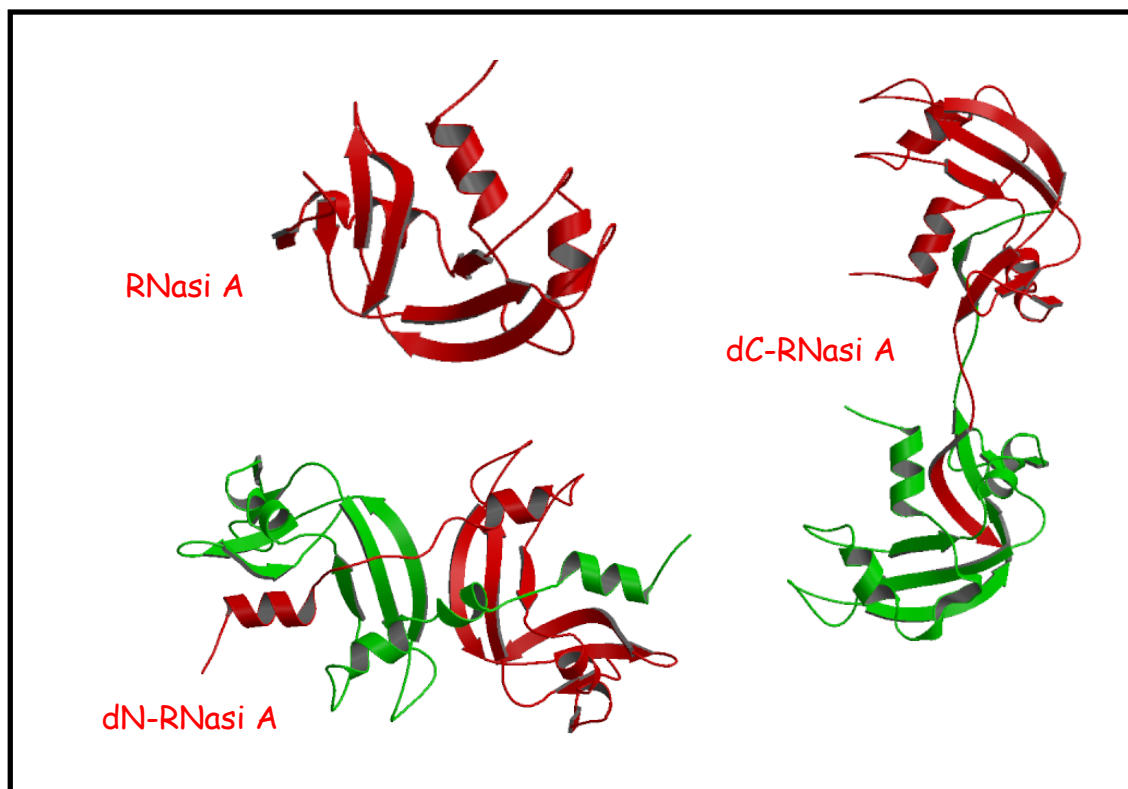


Figura 1.2.: Strutture cristallografiche della RNasi A (Berisio et al., 2002), del dN-RNasi A (Liu et al., 1998) e del dC-RNasiA (Liu et al., 2001).

La sostituzione di Pro101 con Gln incrementa la stabilità del peptide cerniera assicurata dalla formazione di tre legami a idrogeno: ogni Gln forma un legame tra il suo azoto ammidico e l'O^γ della Ser20 della sua catena, e altri due tra il suo O^{ε1} e l'N e l'O^γ della Ser20 dell'altra subunità. Le due Pro19 sono bloccate tra le catene laterali di Gln101 e Tyr25. Le interazioni tra le due subunità sono quindi molto forti e la stabilità dell' *hinge* è aumentata dalla formazione dei tre legami a idrogeno che non possono formarsi quando il residuo 101 è una prolina. E' questo il residuo probabilmente responsabile della formazione di una struttura quaternaria a metà strada tra il dimero naturale della BS-RNasi e il dN-RNasi A.

Le interazioni finora descritte stabilizzano l'interfaccia chiusa, mentre l'unica interazione esistente all'interfaccia aperta è il ponte salino che si forma tra la Glu103 di una subunità e l' Arg104 dell'altra subunità. In accordo con questa struttura, PM8 in soluzione mostra una popolazione monomerica molto più abbondante di quella dimerica, il che rende difficile l'analisi delle sue proprietà.

1.2.5. BS-RNasi

Tutti i dimeri precedentemente descritti possono essere considerati “artificiali” in quanto prodotti in condizioni denaturanti o in seguito alla mutazione della struttura primaria. L'unica ribonucleasi dimerica finora nota è la ribonucleasi seminale bovina (BS-RNasi). E' costituita da due subunità identiche tenute insieme da due ponti disolfurici tra la cisteina 31 di una subunità e la cisteina 32 dell'altra, e viceversa. Il dimero così formato dà luogo a due isoforme dotate di diversa struttura terziaria in equilibrio. In una la coda N-terminale (residui 1-15) di ciascuna catena polipeptidica interagisce con il corpo (23-124) dell'altra subunità (MxM, o dimero scambiato), nell'altra tale scambio non avviene e il segmento N-terminale interagisce con il corpo della propria subunità (M=M, o dimero non scambiato). Lo scambio è mediato dal peptide cerniera (residui 16-22) che connette l'elica dislocata al corpo della proteina e assume due conformazioni leggermente differenti nelle due subunità di MxM.

Le due isoforme in soluzione si interconvertono rapidamente per raggiungere all'equilibrio il rapporto MxM/M=M che in condizioni fisiologiche risulta essere di 2/1 (Piccoli *et al.*, 1992). Le proprietà strutturali risultano ancora più rilevanti se si tiene conto del fatto che oltre alla normale attività ribonucleasica, la BS-RNasi possiede delle proprietà biologiche speciali tra le quali spicca un'elevata attività antitumorale.

La riduzione selettiva dei ponti disolfurici intercatena trasforma MxM in un dimero scambiato non covalente, NCD, mentre da M=M si ottiene il derivato monomerico (Piccoli *et al.*, 1992), che però non mostra le proprietà biologiche speciali della proteina di origine.

La singolarità della BS-RNasi sta nell'essere caratterizzata da un'interscambio tra due strutture dimeriche, a differenza delle altre proteine che presentano il *domain swapping*, per le quali il processo comporta la trasformazione di un monomero in un dimero.

Le strutture cristallografiche dei dimeri, risolte da Mazzarella e collaboratori (Mazzarella, L., *et al.* 1993; Berisio, R., *et al.* 2003) sono riportate in figura 1.3. Studi

cinetici hanno dimostrato che l'isoforma MxM, che ha siti catalitici misti, formati cioè da residui appartenenti a diverse subunità, è un enzima a cooperatività mista (Piccoli et al., 1998) mentre M=M mostra una tipica cinetica michaeliana (Piccoli et al., 1992).

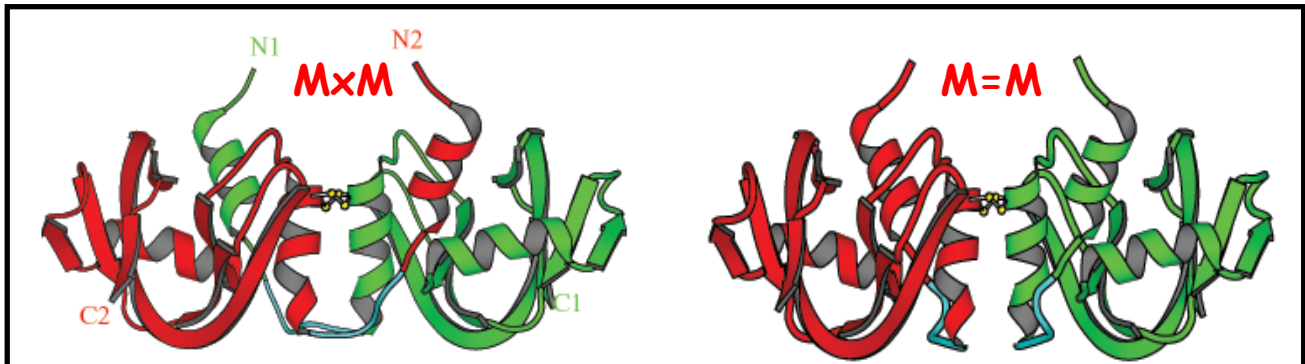


Fig. 1.3.: Strutture cristallografiche di MxM (1BSR) e M=M (1R3M).

1.2.6. NCD-BS-RNasi

La BS-RNasi mostra un'attività citotossica nei confronti di cellule tumorali che sembra essere relazionabile alla sua capacità di sfuggire all'inibitore di ribonucleasi (RI). Questa attività è una proprietà peculiare della isoforma MxM: nell'ambiente riducente del citosol M=M dissocia nelle sue due componenti monomeriche, mentre MxM rimane come dimero non covalente (denominato NCD). La risoluzione della struttura cristallografica di NCD, con le due Cys 31 e 32 carbossiammidometilate con iodoacetammide, mostra una organizzazione della struttura quaternaria molto più simile a quella di MxM che non a quella del dN-RNasi A e a PM8. La costruzione di un modello tra NCD e l'inibitore delle ribonucleasi (RI) rivela che questo è il solo dimero dotato di una struttura quaternaria tale da poter interferire con il legame all'inibitore stesso (Sica et al., 2004).

Così come per MxM i peptidi cerniera conservano la caratteristica di avere un β -turn di tipo I, altamente favorito dalla presenza della Pro19, ma in più il turn si estende fino ad includere un legame a idrogeno tra Ser18 e Ser21. Tra le interazioni intercatena, di particolare interesse sono quelle che coinvolgono l'anello pirrolidinico

di Pro19, che entra bene all'interno di una cavità formata dalle catene laterali di Tyr25 e Gln101 dell'altra subunità, interazione che interessa anche l'isoforma MxM. In PM8 i due peptidi cerniera hanno proprietà strutturali molto simili a quelle di NCD fino alla posizione 19: un cambiamento sostanziale si verifica in corrispondenza dei residui 20-22 che, insieme a Pro91, formano un giro d'elica. Questa variazione provoca un'orientazione differente dell'elica N-terminale e una forma notevolmente diversa del dimero.

Nel caso del dN-RNasi A la sostituzione Pro19Ala aumenta la flessibilità del peptide cerniera (Avitabile et al., 2003) la cui conformazione, diversa in ogni subunità, permette una più efficace organizzazione della superficie di contatto tra le due subunità.

L'interfaccia aperta risulta essere costituita dall'elica 25-32 e in aggiunta ai contatti tra le regioni cerniera si verificano interazioni tra Asn17 e Ser20 di una subunità con His48 e Gln101 dell'altra subunità. Queste interazioni rappresentano un altro elemento in comune con la struttura di PM8.

L'interazione chiave esistente all'interfaccia aperta di NCD è quella formata tra le catene laterali della Leu28. Questa regione di contatto è anche il perno rispetto al quale si orientano le catene polipeptidiche in seguito alla rottura dei ponti disolfurici intercatena di MxM.

1.3. Attività catalitica delle ribonucleasi

1.3.1. Attività ribonucleasica

L'attività enzimatica della BS-RNasi determina l'idrolisi di poliribonucleotidi, con una specificità per legami fosfodiesterici dal lato 3' di basi pirimidiniche. La reazione avviene in due stadi: uno transfosforolitico che genera 2',3'-fosfato ciclici, seguito dall'idrolisi dei ciclofosfati per formare oligonucleotidi 3'-fosfato (Floridi et al., 1972), come illustrato nella figura 1.4.

Studi cinetici hanno indicato che il dimero $M=M$, in cui non è presente lo scambio, presenta una cinetica tipicamente Michaeliana mentre $M \times M$ è regolato allostericamente (Piccoli et al., 1992): nello stadio transfosforolitico l'isoforma mostra un andamento di tipo Michaelis-Menten, mentre nel secondo stadio, quella idrolitico e limitante la velocità di reazione, un andamento bifasico (Piccoli et al., 1982). In particolare, a basse concentrazioni di substrato la curva di saturazione sembra avere un andamento iperbolico; aumentando la concentrazione di substrato essa presenta prima una flessione per poi evolvere in una crescita sigmoidale fino al raggiungimento della zona di "plateau". Questo comportamento cinetico è stato interpretato come effetto di interazioni di tipo cooperativo misto, negativo e positivo, tra i due siti catalitici dell'enzima (Piccoli et al., 1982; Di Donato et al., 1987). Nel caso della BS-RNasi questo fenomeno potrebbe essere dovuto alla dislocazione dei domini che causa la formazione di siti catalitici misti.

Una proprietà peculiare della BS-RNasi è la capacità di scindere RNA a doppio filamento e filamenti di RNA presenti in ibridi DNA-RNA (Libonati e Floridi, 1969; Taniguchi e Libonati, 1974). Tale capacità non sarebbe da attribuire alla dimericità dell'enzima, ma piuttosto alla destabilizzazione della struttura secondaria dei polinucleotidi causata dall'elevata densità di carica in regioni discrete della proteina (Libonati et al., 1975; Sorrentino e Libonati, 1994).

Studi condotti sulla capacità della BS-RNasi di degradare RNA a doppio filamento hanno mostrato che le mutazioni dei residui D38 e E111 nella RNasi A con i corrispondenti residui della BS-RNasi (G38 e G111), erano in grado di conferire alla proteina monomerica questa particolare proprietà biologica, assente nella proteina nativa.

L'ulteriore introduzione delle cisteine 31 e 32, necessarie per l'acquisizione della struttura quaternaria, consentiva all'enzima pancreatico dimerico, mostrante una piccola quantità di scambio (circa il 20% di $M \times M$), di acquisire un'attività degradativa su RNA a doppio filamento simile a quella mostrata dalla BS-RNasi.

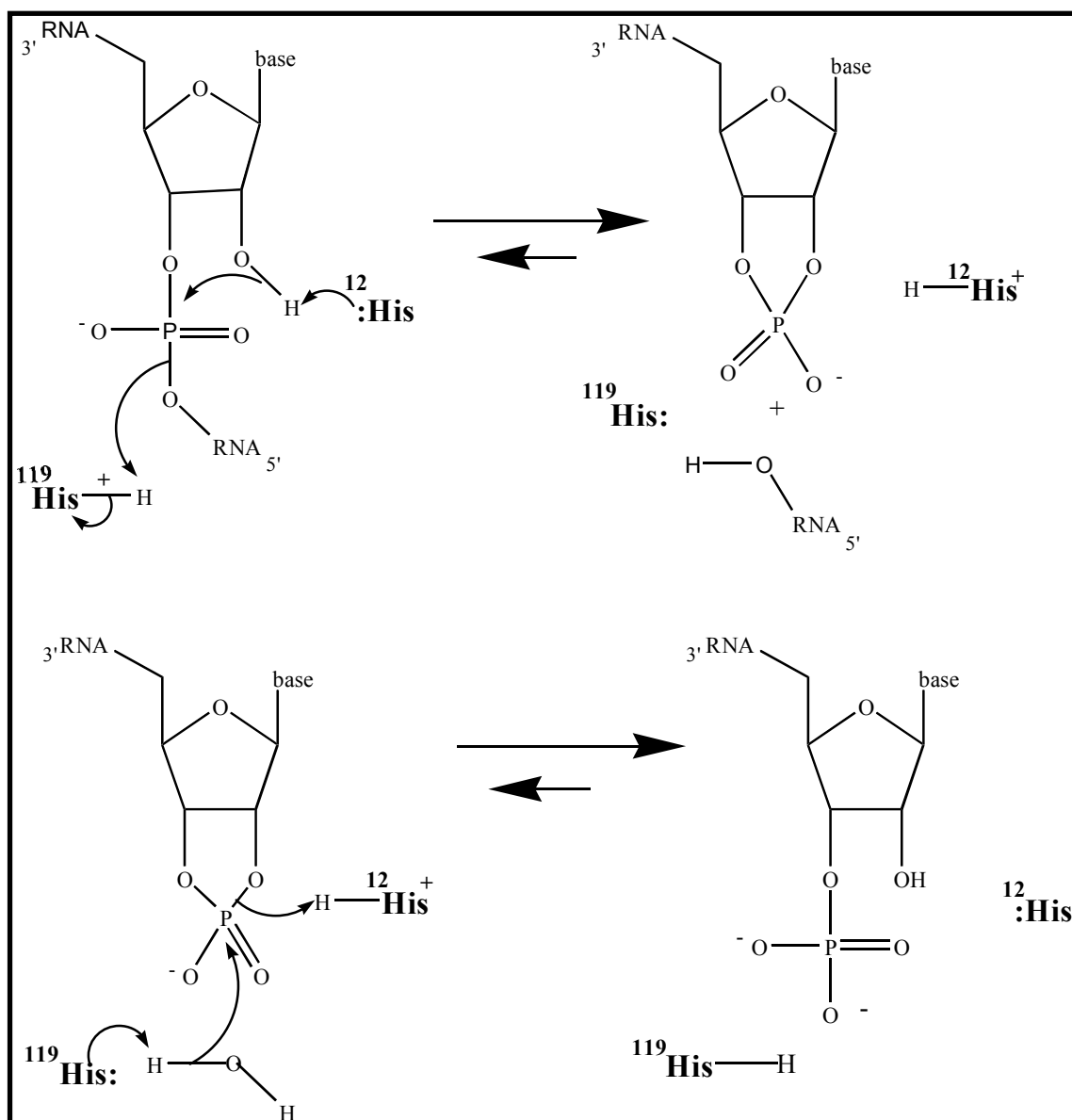


Fig. 1.4.: Reazione di transfosforilazione e di idrolisi catalizzata dalla BS-RNasi

La conferma di questi risultati è stata poi ottenuta mediante la realizzazione del mutante complementare: gli stessi residui dell'enzima seminale furono sostituiti con quelli della RNasi A. Il risultato fu un decremento dell'attività del monomero di BS-RNasi mutato: ciò rappresenta una conferma dell'importanza dei residui presi in considerazione (38 e 111) per l'acquisizione dell'attività degradativa su RNA a doppio filamento e l'attribuzione di un piccolo anche se significativo ruolo della struttura dimerica nell'acquisizione di tale attività (Opitz et al., 1998).

1.3.2. Proprietà biologiche speciali

La BS-RNasi è dotata di peculiari azioni biologiche, in particolare di attività antitumorale, immunosoppressiva, antispermatogenica e antivirale (Irie, 1997; Matousek, 1973). La struttura dimerica delle ribonucleasi sembra essere fondamentale per l'acquisizione di proprietà biologiche speciali, giacché i derivati monomerici della BS-RNasi sono sprovvisti di tale attività (D'Alessio et al., 1991; Vescia et al., 1980; Kim et al., 1995a), mentre dimeri artificiali della RNasi A sono agenti antitumorali. La più rilevante tra le proprietà speciali è di certo la sua tossicità selettiva verso le cellule maligne; tale azione citotossica è esercitata dopo l'internalizzazione dell'enzima nel citosol delle cellule maligne, dove degrada l'RNA ribosomiale bloccando la sintesi proteica (Mastronicola et al., 1995).

La citotossicità delle RNasi dipende da diversi fattori, tra cui il processo di internalizzazione cellulare e la capacità di evadere l'inibitore proteico delle ribonucleasi (RI) presente nel citoplasma (Leland et al., 1998).

Il meccanismo con cui le RNasi attraversano la membrana cellulare non è ancora noto. Attraverso lo studio di mutanti della BS-RNasi in cui le regioni che presentavano maggiore differenza nella struttura primaria con la RNasi A venivano sostituiti con i corrispondenti residui di quest'ultima proteina, Kim et al (1995b) osservarono che i mutanti conservavano l'attività citotossica assente nella RNasi A, dimostrando così l'assenza di recettori specifici di membrana. Ciò ha permesso di ipotizzare che queste proteine siano internalizzate mediante endocitosi (Haigis and Raines, 2003). All'interno del citoplasma, le RNasi formano un complesso con RI e perdono la loro attività catalitica, che risulta essere indispensabile affinché questi enzimi funzionino da citotossine. RI è una proteina caratterizzata da elementi strutturali di tipo α - β , ricchi di residui di leucina, che si ripetono 15 volte e disposti in modo tale da conferirgli una caratteristica forma a ferro di cavallo (Kobe & Deisenhofer, 1993). La forma attiva di RI contiene numerosi residui di cisteina ridotti, stabili nell'ambiente riducente del citosol. In condizioni ossidanti, invece, RI perde la sua capacità di legare le RNasi e viene rapidamente degradato dalle proteasi

cellulari (Blazquez et al., 1996). L'azione di RI, inoltre, è di tipo specie-specifico (Roth, 1962): per questo motivo gli inibitori proteici delle RNasi dei mammiferi non legano le ribonucleasi estratte da anfibi, le quali possono degradare l'RNA senza alcuna sorta di controllo e causare così la morte della cellula.

Come per le RNasi da anfibi, anche l'attività citotossica di BS-RNasi è strettamente correlata alla capacità di evadere l'inibitore proteico, e in particolare alla dimericità dell'enzima seminale.

L'onconasi è un omologo della RNasi A estratta dalla rana leopardo del nord europa. Al momento questo enzima è in fase III di sperimentazione clinica contro il mesotelioma maligno della pleura. E' stato dimostrato che l'attività catalitica ribonucleasica è necessaria per conferire alla proteina attività citotossica (Kim et al. 1995), anche se questa non è l'unico requisito richiesto. La RNasi A ha un'attività catalitica sicuramente maggiore dell'onconasi ma non è citotossica.

Le due proteine differiscono anche per un'altra proprietà: la stabilità conformazionale. Il valore di T_m per l'onconasi è di 90°C per la RNasi A 63°C. E' lecito chiedersi se la stabilità conformazionale è quindi legata alla citotossicità delle ribonucleasi.

In un lavoro effettuato da Klink e Raines la sostituzione dei residui Ala4 e Val118 con due residui di cisteina ha consentito l'ottenimento di un mutante della RNasi A in cui la coda N-terminale era bloccata dalla formazione di un nuovo ponte disolfurico (Cys4 – Cys118).

Il mutante considerato che possedeva un'ulteriore mutazione in posizione 88 (questa sostituzione è da sola in grado di conferire alla RNasi A attività citotossica) oltre a divenire più stabile termicamente ($T_m = 68.8^\circ\text{C}$), diventava più resistente all'attacco proteolitico e sorprendentemente diventava almeno tre volte più citotossico del singolo mutante G88R RNasi A (Klink and Raines, 2000). Altri mutanti in cui venivano sostituiti i residui di cisteina responsabili della formazione dei ponti disolfurici intracatena mostravano una diminuzione lineare delle varie proprietà a seconda del numero di ponti disolfurici eliminati.

1.4. Alterazione della propensione allo swapping

Le mutazioni all'interfaccia aperta possono alterare la struttura del dimero scambiante (Liu et al., 1998). La singola sostituzione di Pro101 con Gln nel dimero di PM8 è una conferma di questa ipotesi: la mutazione ha un effetto sul peptide cerniera promovendo la formazione di un elica 3_{10} che diminuisce la distanza tra il corpo della proteina e la coda dislocata.

L'accorciamento dell' *hinge* può rappresentare una strategia per l'ottenimento di dimeri scambiati: il costo entropico dell'associazione è più che compensato energeticamente da una conformazione estesa dell' *hinge* accorciato più favorita nel dimero scambiato.

Nel 1995 Green et al. durante lo studio di forme mutanti di una nucleasi da stafilococco accidentalmente recuperarono un mutante di delezione (del 114-119) che sorprendentemente era in grado di dimerizzare. La struttura cristallografica del dimero mutante così ottenuto mostrava lo scambio dell'elica C-terminale (Green et al., 1995). Nel 2000 Ogihara et al., hanno dimostrato la possibilità di indirizzare specificamente, attraverso la progettazione di mutanti di delezione, l'interscambio di domini verso la formazione di dimeri o di fibrille (Ogihara, et al., 2001).

Quando invece nell' HP-RNasi vengono deleti 5 residui dal peptide cerniera (dal 16 al 20) il mutante ottenuto mostra una elevata tendenza a dimerizzare probabilmente dovuta al fatto che anche quando dissocia nelle sue due componenti monomeriche la coda N-terminale non è in grado di ripiegarsi all'interno in modo corretto. Esperimenti di cross-linking hanno indicato che il dimero ottenuto scambia la coda N-terminale e studi di modeling molecolare hanno mostrato che l'unico modello plausibile è quello del dimero N della RNasi A (Russo et al., 2000).

Anche l'allungamento del peptide cerniera può favorire lo scambio di domini strutturali (Rousseau et al., 2003). Da un punto di vista termodinamico, l'inserzione di residui nella regione del peptide cerniera ha effetto sia sull'entalpia sia sull'entropia del sistema. La struttura quaternaria dell'oligomero non solo permette la formazione di interazioni intermolecolari (contributo entalpico), ma fornisce un grado

di libertà conformazionale in più dal momento che la struttura del peptide cerniera non è strettamente fissata dalla struttura terziaria della specie monomerica (contributo entropico).

Anche la sequenza del peptide cerniera può alterare la propensione allo scambio. Un'analisi delle sequenze di molti peptidi cerniera ha mostrato la presenza in molti di essi di residui di prolina e/o glicina, entrambi residui con caratteristiche peculiari. La glicina è il residuo con il maggior grado di libertà conformazionale e la sua presenza nell' *hinge* potrebbe essere dovuta alla necessità del peptide cerniera di dover assumere diverse conformazioni nel monomero e nell'oligomero scambiato. La prolina, invece, restringe il campo conformazionale accessibile (Bergdoll et al., 1997), introducendo rigidità nella catena principale tra due residui consecutivi. La sua presenza quindi rende meno probabile il raggiungimento di una conformazione del peptide di minima energia nell'ambito della struttura terziaria della forma monomerica. D'altro canto, una certa flessibilità della struttura quaternaria, come spesso accade, aumenta la probabilità di trovare una struttura scambiante del peptide cerniera a più bassa energia.

L'analisi delle sequenze delle regioni cerniera non ha consentito l'abbinamento sequenza-funzione in quanto risultano essere tutti differenti tra loro: essi variano in lunghezza e composizione e anche se sono estremamente frequenti residui di prolina il loro numero e la loro posizione è molto variabile, giungendo anche a tre residui in un solo *hinge*.

Il ruolo assegnato alla prolina è basato non solo sulla sua forte conservazione in proteine correlate e sulla sua frequente presenza nelle regioni cerniera di proteine non correlate, ma anche su studi di mutagenesi sito-specifica che hanno mostrato che la sua sostituzione influenza il processo di scambio.

Anche nella BS-RNasi il peptide *hinge* contiene un residuo di prolina. Sebbene si sia a lungo supposto che questo fosse uno dei residui principalmente coinvolti nel meccanismo dell'interscambio, è stato riscontrato che la sostituzione di tale residuo non altera il rapporto di equilibrio tra le due isoforme dimeriche, che risulta essere

ancora di 2/1 (Ercole, C., et al. 2003), né la cinetica di scambio dell'elica N-terminale.

1.5. Studi di mutagenesi sul modello delle ribonucleasi

Un sistema particolarmente interessante per lo studio del fenomeno dell'interscambio di domini è costituito dalle ribonucleasi per la presenza del prototipo monomerico, la RNasi A, e la controparte dimerica naturale, la BS-RNasi. Su questo sistema è possibile l'uso di un approccio sperimentale del tipo "homologe-scanning mutagenesis" mediante il quale i residui chiave responsabili del fenomeno d'interesse vengono sostituiti con i residui di proteine omologhe con diverse proprietà. Nel caso del sistema BS-RNasi/RNasi A ci sono due approcci possibili, che danno informazioni diverse: partendo infatti dalla RNasi A e introducendo in essa i corrispondenti residui della BS-RNasi si possono ottenere informazioni sull'effetto del singolo residuo sull'interscambio in condizioni denaturanti mentre l'introduzione dei residui della RNasi A nella sequenza amminoacidica della BS-RNasi consente di studiare lo swapping in condizioni fisiologiche.

In un lavoro effettuato nel 1995 (Kim et al.) i residui di Cys31 o Cys32, responsabili della formazione dei ponti disolfurici nella BS-RNasi, sono stati sostituiti con Ser. I mutanti dimerici ottenuti, che possedevano un solo ponte disolfurico anziché due, mostravano un'attività catalitica inalterata, ma all'equilibrio solo il 23% di dimero C31S e il 29% di dimero C32S erano presenti come isoforma MxM, indicando una maggiore stabilità dell'isoforma M=M. La riduzione dell'attività citotossica, così come di tutte le altre proprietà biologiche speciali peculiari della BS-RNasi, ha consentito di formulare l'ipotesi che queste siano dovute alla forma MxM.

In un lavoro effettuato nei laboratori del prof. D'Alessio è stato preparato un mutante della BS-RNasi nel quale i residui Ala4 e Val118 sono stati sostituiti con due residui di cisteine: nel mutante, denominato 24C, l'introduzione del ponte disolfurico tra il

residuo 4 e il 118 ha bloccato lo scambio, consentendo l'ottenimento dell'isoforma M=M pura (Russo et al., 2002).

Saggi enzimatici hanno poi mostrato che 24C è non solo meno attivo della BS-RNasi dal punto di vista catalitico ma ha un'attività citotossica almeno tre volte più bassa. Ciò è probabilmente da ascrivere ancora una volta alla unicità della BS-RNasi che deve le sue proprietà biologiche speciali alla sua struttura quaternaria: la bassa attività citotossica sia di M=M che di 24C può essere attribuita all'assenza dello scambio in queste proteine delle quali solo una piccola frazione rimane dimero quando vengono introdotte nell'ambiente riducente del citosol (Russo et al., 2002).

L'importante ruolo che può giocare la Pro19 nell'interscambio può essere valutato mediante introduzione di tale residuo in posizione 19 della RNasi A. Studi energetici effettuati su questo mutante (Mazzarella et al., 1995) hanno messo in evidenza che la sostituzione di Ala19 con Pro nella RNasi A induce una posizione più esterna della regione cerniera con una diminuzione del numero di interazioni con il resto della proteina.

Nel lavoro svolto invece nei laboratori del prof. Di Donato (1994, 1995) l'idea è stata quella di trasformare una ribonucleasi monomerica (RNasi A) in una dimerica (BS-RNasi) mediante mutagenesi sito-specifica. I residui presi in considerazione sono quelli nelle posizioni 19,28,31 e 32. L'introduzione delle quattro mutazioni (mutante denominato PLCC), ha consentito l'ottenimento di un dimero in grado di scambiare con una composizione all'equilibrio dell'isoforma MxM pari a quella della BS-RNasi nativa (Di Donato et al., 1994). Quando sono state inserite le Cys 31 e 32, il dimero ottenuto mostrava una significativa propensione allo scambio (circa 15%), l'ulteriore inserimento della Pro 19 ha aumentato la quantità di MxM (circa 40%) che è divenuta il 65 % in seguito all'introduzione della Leu28.

I mutanti dimerici ottenuti mostravano un'attività catalitica inferiore rispetto alla proteina nativa ma in essi si osservava un incremento dell'attività antitumorale che in PLCC, era pari alla metà di quella della BS-RNasi. I mutanti monomerici mostravano invece una crescente propensione allo scambio quando liofilizzati da acido acetico ed

una maggiore resistenza alla subtilisina, una proteasi in grado di idrolizzare selettivamente la RNasi A e non la BS-RNasi probabilmente per la sostituzione Ala / Pro.

Successivamente (Ciglic et al., 1998) mediante mutagenesi sito-specifica effettuata sui residui 31 e 32 della RNasi A, cioè sui residui responsabili della formazione dei ponti disolfurici intercatena nella BS-RNasi, hanno mostrato che l'introduzione di un singolo residuo di cisteina in posizione 31 o 32 è sufficiente per la formazione di un dimero. Tuttavia esso non è in grado di scambiare la coda N-terminale e di formare quindi i siti catalitici misti. Inoltre gli stessi autori hanno mostrato che il mutante Q28L/K31C/S32C RNase A dà luogo ad un dimero in grado di scambiare la coda N-terminale raggiungendo una composizione all'equilibrio del 40% di MxM confermando i dati ottenuti da Di Donato et al. La mutazione ulteriore del residuo 19 con Pro favorisce ulteriormente il processo di scambio raggiungendo una composizione dell' 85%. L'analisi dei mutanti doppi A19P S32C / A19P K31C / A19P K31C S32C mostrava una quantità sempre crescente di isoforma MxM, passando dal 20, 30 fino ad arrivare al 40%.

1.6. Progetto di tesi

La complessità del modello ribonucleasi per la spiegazione del fenomeno del “*domain swapping*” rende conto del perché sia la RNasi A sia la BS-RNasi, benché siano proteine investigate già da molto tempo, rivestono ancora oggi notevole interesse scientifico.

Nel mio lavoro di tesi mi sono occupato dell' individuazione dei determinanti strutturali responsabili del fenomeno dell'interscambio di domini nelle ribonucleasi attraverso un approccio di tipo mutagenico.

Il modello ribonucleasi risulta essere particolarmente interessante in quanto la BS-RNasi, data la sua natura di dimero covalente, risulta essere l'unico caso finora noto in cui il fenomeno non riguarda un equilibrio monomero–dimero bensì un'isomerizzazione tra due dimeri, l'isoforma scambiata (MxM) e quella non

scambiata (M=M). Nel dimero scambiante di BS-RNasi l'esistenza di due forti vincoli di struttura quaternaria (ponti disolfurici intercatena e interscambio di domini) fa perdere un grado di libertà conformazionale della struttura quaternaria (orientazione relativa delle due subunità) e quindi fissa la distanza che deve essere coperta dal peptide cerniera. Questa proprietà ci consente di studiare gli effetti che sostituzioni singole o combinate possono avere sul processo del *domain swapping*, senza che ciò comporti un cambio nella struttura quaternaria, come avviene invece in altre proteine.

La BS-RNasi mostra un'identità di sequenza dell'81% rispetto alla RNasi A ciò nonostante le proprietà strutturali nonché quelle biologiche presentano sostanziali differenze.

Va ricordato che anche la RNasi A è in grado di dimerizzare, sebbene in condizioni chimiche estreme (liofilizzazione da acido acetico); la struttura cristallografica dei due dimeri della RNasi A non mostra in nessun caso caratteristiche simili a quelle della BS-RNasi (Liu et al.; 1998, Liu et al., 2001).

La strategia seguita nel lavoro è stata quella di studiare l'effetto dei determinanti strutturali responsabili del fenomeno dell'interscambio di domini mediante mutagenesi per omologia utilizzando come parte di questo sistema modello la RNasi A e la BS-RNasi. Si è proceduto con la mutazione del residuo o dei residui delle regioni principalmente coinvolte nel fenomeno con i corrispondenti residui presenti nella controparte.

Dati NMR ottenuti sul derivato monomerico della BS-RNasi (Avitabile et al., 2003) e dati riportati in letteratura (Mazzarella et al., 1993) indicano che la regione più flessibile della BS-RNasi è l' *hinge* (residui 16-22), che è anche la regione che presenta le maggiori differenze di sequenza amminoacidica con la RNasi A (tab. 1.2.). E' stato dimostrato che uno dei ruoli più critici per la trasformazione monomero-dimero è svolto dal peptide cerniera (Rousseau et al., 2003), l'unica regione che cambia conformazione in questa trasformazione e da più parti ipotizzato che uno dei residui principalmente coinvolti nello "swapping" sia la prolina (Bergdoll

et al., 1997). Per questo motivo nella mia tesi di laurea mi sono occupato del mutante in cui la Pro19 è stata sostituita con il corrispondente residuo della RNasi A, una Ala (P19A-mBS). Il mutante ottenuto ha mostrato una composizione all'equilibrio pari a quella della proteina nativa tale da essere considerato un intermedio per la progettazione di altri mutanti.

Nel corso del lavoro svolto per la tesi di dottorato ho focalizzato inizialmente l'attenzione sul residuo di Leu28, che si trova all'interfaccia aperta e forma delle interazioni idrofobiche tra le catene laterali dei due residui. E' stato quindi progettato un mutante nel quale la Leu28 è stata sostituita con la Glu (L28Q-mBS), ed un secondo mutante contenente entrambe le mutazioni P19AL28Q-mBS (denominato PALQ-mBS). Studi di mutagenesi precedentemente effettuati sulla RNasi A avevano mostrato l'importanza di questi residui entrambi essenziali sia per la dimerizzazione sia per l'interscambio delle estremità N-terminali insieme alle due cisteine 31 e 32 responsabili dei ponti disolfurici intercatena (Di Donato et al., 1994).

Onde poter chiarire il ruolo effettivo giocato dal peptide cerniera nel fenomeno dell'interscambio di domini, sia in condizioni fisiologiche sia in condizioni denaturanti, sono stati preparati il mutante denominato *hA*-mBS in cui l'intero *hinge* della BS-RNasi è stato sostituito con i corrispondenti residui della RNasi A e quello denominato *hBS*-RNasi A in cui l' *hinge* della RNasi A è stato sostituito interamente con quello della BS-RNasi.

Il lavoro è poi proseguito focalizzando l'attenzione sul residuo 80, che nella BS-RNasi è un'arginina mentre nella RNasi A è una serina. Nella RNasi A esiste un legame a H tra il gruppo ossidrilico della Ser80 e l'ossigeno carbonilico della Ser18. Dati di letteratura mostrano che, quando il residuo in posizione 80 viene sostituito con il corrispondente residuo della BS-RNasi (arginina), l' *hinge* appare molto più disordinato e non presenta interazioni con altri residui (Vatzaki et al., 1999). La struttura cristallografica di tale mutante mostra chiaramente che i residui coinvolti nell'interazione, precedentemente citata, cambiano la loro conformazione spaziale puntando in direzioni diverse; non potendo più interagire tra loro permettono all'

hinge di muoversi più liberamente, il che incrementa le proprietà immunosoppressive del mutante, ma lo rende più suscettibile ad un attacco proteolitico (Vatzaki et al., 1999).

Partendo da questi dati sono stati progettati due mutanti della BS-RNasi: nel primo (R80S-BS-RNasi) l'Arg80 è stata sostituita con una Ser; nel secondo (R80S/*hA*-BS-RNasi) la stessa mutazione è stata effettuata sul mutante contenente nel tratto 16-22 la sequenza della RNasi A.

Tabella 1.2.: Allineamento delle sequenze della BS-RNasi e della RNasi A.

BS	KESAA	AKFER	QHMDS	GNSPS	SSSNY	CNLMM	30
A	KETAA	AKFER	QHMDS	STSAA	SSSNY	CNQMM	30
BS	CCRKM	TQGKC	KPVNT	FVHES	LADVK	AVCSQ	60
A	KSRNL	TKDRC	KPVNT	FVHES	LADVQ	AVCSQ	60
BS	KKVTC	KNGQT	NCYQS	KSTMR	ITDCR	ETGSS	90
A	KNVAC	KNGQT	NCYQS	YSTMS	ITDCR	ETGSS	90
BS	KYPNC	AYKTT	QVEKH	IIVAC	GGKPS	VPVHF	120
A	KYPNC	AYKTT	QANKH	IIVAC	EGNPY	VPVHF	120
BS	DASV						
A	DASV						

Residui conservati in rosso
Residui differenti in blu

I derivati monomerici delle proteine sono stati espressi, purificati e caratterizzati mediante saggi di attività, dicroismo circolare ed NMR. Tutti i mutanti ottenuti hanno mostrato un corretto folding simile a quello delle proteine *wilde type* e ciò ha consentito poi lo studio successivo del fenomeno dell'interscambio di domini. Lo studio è stato condotto seguendo due filoni: lo scambio in condizioni fisiologiche e quello in condizioni non fisiologiche.

Nel primo caso mi sono occupato dell'analisi dell'interconversione delle due isoforme, $M=M / M \times M$, valutando l'eventuale alterazione della composizione all'equilibrio e cercando dove possibile l'isolamento delle isoforme pure per consentirne l'analisi strutturale mediante raggi X realizzata in collaborazione con il gruppo del Prof. Mazzarella. L'analisi del fenomeno dell'interscambio ha poi

richiesto un'analisi delle stabilità in soluzione dei dimeri non covalenti (NCD) dei mutanti della BS-RNasi ed è in corso di studio una loro caratterizzazione strutturale mediante raggi X.

Nel secondo caso invece i derivati monomerici ottenuti sono stati sottoposti a condizioni chimiche estreme, come ad esempio la liofilizzazione da acido acetico, ed è stato verificato l'effetto della mutazione sulla struttura quaternaria degli oligomeri ottenuti. Questi ultimi, separati mediante tecniche cromatografiche, sono stati caratterizzati e paragonati con le proteine di origine.

L'insieme dei dati ottenuti nel corso dell'intero lavoro ha consentito di formulare delle ipotesi sulla struttura dei dimeri ottenuti mediante liofilizzazione da acido acetico in attesa che ne sia risolta la struttura cristallografica e di formulare delle ipotesi su uno dei ruoli possibili del peptide cerniera nel passaggio evolutivo dalla RNasi A alla BS-RNasi.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1. Mutagenesi

2.1.1. Mutagenesi sito-specifica mediante PCR

La mutagenesi sito-specifica viene effettuata con il sistema QuikChange della Stratagene, che permette di ottenere rapidamente mutanti con un'efficienza del 80%. Il metodo prevede l'utilizzo di un vettore di DNA a doppio filamento, due oligonucleotidi sintetici complementari contenenti la mutazione desiderata (figura 2.1) e una polimerasi termostabile, la PfuTurbo DNA polimerasi, che replica entrambi i filamenti plasmidici senza rimuovere i "primers" mutati. Per la reazione di polimerizzazione a catena (PCR), è utilizzato lo strumento "Mastercycler personal" prodotto dalla Eppendorf. Il DNA plasmidico utilizzato come stampo per la mutagenesi deve essere metilato per essere suscettibile alla digestione con Dpn I; si utilizza quindi uno stampo isolato da un ceppo cellulare di *E.Coli* con genotipo dam^+ . La Dpn I è un'endonucleasi specifica per DNA metilati ed emimetilati, usata per digerire il DNA parentale e selezionare quello contenente la mutazione. Il vettore mutato, viene usato per la trasformazione di cellule supercompetenti XL1-Blu. La piccola quantità di DNA stampo inizialmente richiesta per effettuare questo metodo, l'alta fedeltà della DNA polimerasi, il basso numero di cicli termici e la bassa probabilità di ottenere mutazioni casuali, contribuiscono all'alta efficienza di questa procedura. Il plasmide mutato viene sintetizzato a partire dai "primers" mutagenici che devono essere progettati con una temperatura di fusione (T_m) maggiore o uguale a 78°C ed una lunghezza compresa tra 25 e 45 basi. La formula per determinare la T_m è la seguente:

$$T_m = 81.5 + 0.41 * (\% G e C) - \left(\frac{675}{N} \right) - (\% mismatch)$$

(N è il numero totale di basi)

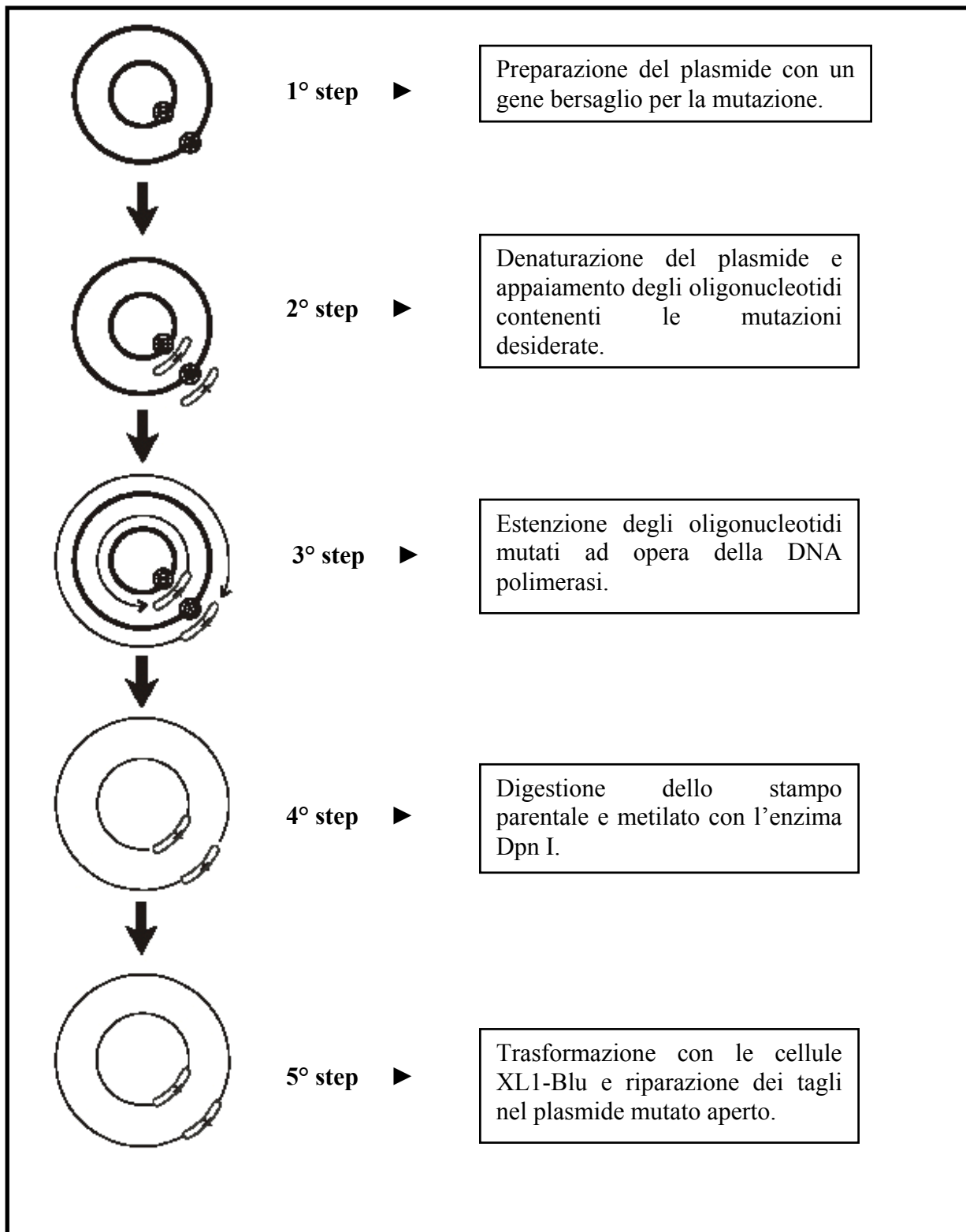


Figura 2.1: Metodo QuiKChange per mutazioni sito-specifiche

Utilizzando le regole appena descritte sono stati disegnati i seguenti oligonucleotidi mutagenici:

R80S(1): 5' GCAAATCCACCATGAGCATCACAGACTGCCG 3'

R80S(2): 5' CGGCAGTCTGTGATGCTCATGGTGGATTTC 3'

A19P/A20S(1):5' CACATGGACTCCAGCACTTCCCATCCAGCAGCTCCAACTACTG 3'
A19P/A20S(2):5' CAGTAGTTGGAGCTGCTGGATGGGGGAAGTGCTGGAGTCCATGTG 3'

I “primers” R80S(1)/(2) sono stati utilizzati per ottenere un ulteriore mutante nel quale oltre alla singola mutazione in posizione 80 era presente l'intero *hinge* della RNasi A (R80S/*hA*-mBS); per questo mutante si è utilizzato come stampo il vettore contenente il gene che codifica *hA*-mBS.

1. 3 min a 95°C - fase di denaturazione
2. 30 sec a 95°C - fase di denaturazione
3. 1 min a 55°C - fase di annealing
4. 6 min a 68°C - fase di polimerizzazione
5. Si ripetono gli step da 2 a 4 per 15 volte

Si addiziona 1µl di enzima di restrizione DpnI (10 U/ µl) e la miscela di reazione viene incubata a 37°C per 1h, per la digestione dei filamenti parentali; infine si effettua una trasformazione con cellule supercompetenti XL1-Blu usando quantità diverse dell'amplificato PCR.

Dei cloni selezionati è stata eseguita una minipreparazione del DNA plasmidico, inviata ad una ditta esterna per il sequenziamento che ha confermato la presenza delle mutazioni.

2.1.2. Metodo del "Megaprimer"

Il metodo del "Megaprimer" per la mutagenesi sito-specifica usa tre oligonucleotidi "primers" e due step di PCR. Uno degli oligonucleotidi è mutagenico, mentre gli altri due si appaiono rispettivamente all'inizio e alla fine della regione da amplificare.

Questo metodo di mutagenesi può essere utilizzato solo quando la mutazione da introdurre si trova ad una delle estremità del gene clonato.

Il "primer" mutagenico insieme al "primer" che si appaia con la regione di DNA più vicina alla mutazione sono utilizzati in un primo step di PCR per amplificare quella regione che prende il nome di "megaprimer". Quest'ultimo è utilizzato in un secondo step di PCR, nella stessa provetta dove è avvenuto il primo step, in presenza dell'altro "primer", per amplificare l'intero gene (fig. 2.2). Il vantaggio di questo metodo è proprio la possibilità di evitare passaggi di purificazione intermedi del DNA che comporterebbe una enorme perdita di materiale e anche di tempo.

Tutto questo è possibile giocando sulle diverse temperature di "annealing" dei diversi "primer". Il "megaprimer" viene sintetizzato partendo da un "primer" mutagenico che deve essere progettato con una bassa temperatura di fusione (T_m) ed una lunghezza compresa tra 16 e 25 basi. La mutazione desiderata deve cadere al centro del "primer" mutagenico e la regione del "mismatch" deve avere sia a destra che a sinistra 8-10 basi correttamente appaiate con lo stampo.

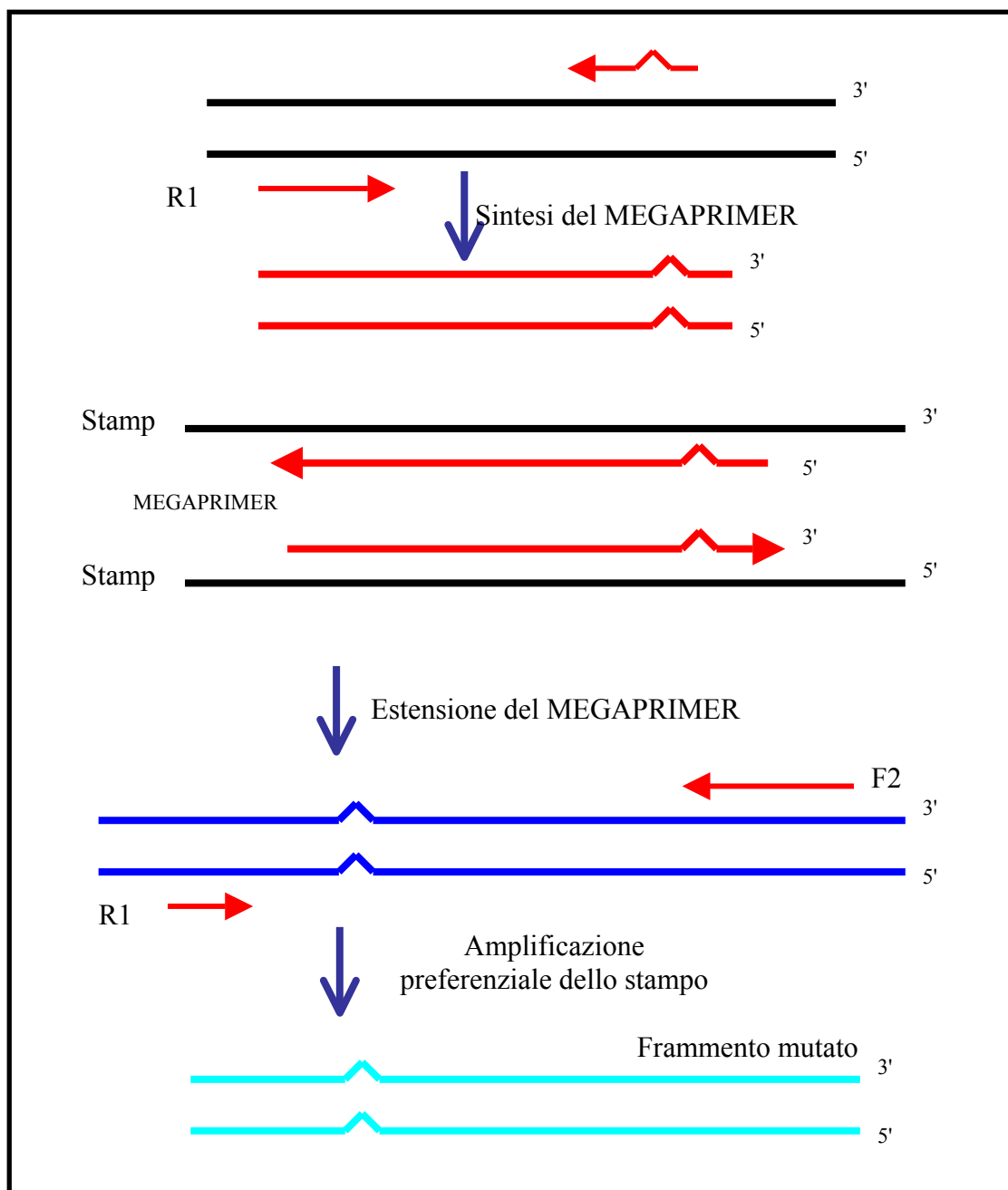


Fig.2.2: Rappresentazione schematica del metodo del Megaprimer.

Per quanto riguarda gli altri due "primer", quello utilizzato nel primo step di PCR deve avere una lunghezza di 15-16 basi e una T_m tra 42°C e 46°C. La T_m degli oligonucleotidi è stata calcolata usando la seguente formula:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

dove (G+C) è la somma dei residui di guanina e citosina e (A+T) è la somma dei residui di adenina e timina.

Il primer utilizzato nel secondo step di PCR deve essere progettato con una lunghezza di 25-30 basi ed una T_m tra i 72°C e 85°C.

Entrambi i "primers" devono possedere un sito di restrizione unico, posseduto anche dal vettore di espressione, in modo che il frammento mutato ed amplificato può essere digerito e clonato nel vettore .

Il primo passo per la realizzazione dei mutanti mediante il metodo del Megaprimer è stata la progettazione dei "primers" esterni denominati BS_1 e BS_2 per i mutanti della BS-RNasi e A_1 e A_2 per i mutanti della RNasi A. Il passo successivo è stato il disegno dei "primers" mutagenici utilizzati nel primo step di PCR.

Tutti gli amminoacidi sono degeneri ed esistono più triplette di basi codificanti ciascun residuo; è stato scelto il codone che, nel gene codificante la proteina, era più rappresentato per l' amminoacido introdotto. Gli oligonucleotidi sono stati così disegnati:

- Mutanti della BS-RNasi

BS_1:	5'	ATATACATATGAAAGAAAG	3'
BS_2:	5'	GAGTGCGGCCGCAAGCTTGGGCTG	3'
L28Q:	5'	CACATCAT <u>CCT</u> GGTTGCAA	3'
G16S/N17T/P19A:	5'	TAGCAGAG <u>GGT</u> GCTGCTGTC	3'
G16S/N17T/P19A/S20A:	5'	GAAGAGCT <u>AGC</u> AGCAGAG	3'

- Mutanti della RNasi A

A_1:	5'	GATATACATATGAAGGAA	3'
A_2:	5'	GCCGCAAGCTTGCATGCCTGCAGG	3'
S16G/T17N:	5'	GCGGAG <u>TTGCC</u> GGAGT	3'

Le triplette in grassetto sono quelle contenenti i siti di restrizione per le nucleasi, quelle sottolineate e in corsivo sono relative ai residui sostituiti.

Nella preparazione dei mutanti si è utilizzato come stampo per i derivati della BS-RNasi il pET-22b(+) contenente l'inserto in cui l' Asn67 è sostituita con un Asp per evitare fenomeni di deamidazione spontanea in questo sito, che rendono

notevolmente più complicata l'interpretazione dei risultati (Di Donato e D'Alessio, 1981; Di Donato et al., 1986). I mutanti P19A/L28Q-mBS (denominato PALQ-mBS) e G16S/N17T/P19A-mBS sono stati realizzati utilizzando come stampo il vettore codificante P19A-mBS mentre il mutante G16S/N17T/P19A/S20A-mBS (denominato *hA*-mBS) si è ottenuto a partire dal gene codificante G16S/N17T/P19A-mBS. L'introduzione delle mutazioni nelle posizioni 16 e 17 della RNasi A per ottenere il mutante S16G/T17N/A19P/A20S RNasi A (denominato *hBS*-RNasi A) è stato realizzato utilizzando come stampo il gene del mutante A19P/A20S RNasi A ottenuto con il metodo descritto nel paragrafo precedente.

In ogni step mutagenico il gene amplificato, e anche mutato, è stato digerito con gli enzimi di restrizione NDE1 e HINDIII e clonato nel plasmide pET-22b(+) trattato con gli stessi enzimi.

L'inserimento della corretta mutazione è stata confermata mediante sequenziamento del cDNA effettuato presso una ditta esterna.

2.1.3. Reazione a catena della DNA polimerasi

Per la reazione di polimerizzazione a catena è necessario l'utilizzo di una DNA polimerasi termostabile e provette da 0.5 ml sterili. E' stato utilizzato l'apparecchio della Genenco MJ Research.

Per allestire la reazione 140 ng di DNA stampo sono fatti reagire in presenza dei quattro deossinucleotidi trifosfati (200 μ M), dell'oligonucleotide mutagenico (10 pmoli), di quello a bassa T_m (100 pmoli), dell'enzima *DyNAzyme EXT* DNA-polimerasi (2.5 unità) e del tampone dell'enzima (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM $MgCl_2$, 15 mM $(NH_4)_2SO_4$ e 0.1% Triton X-100).

I campioni così preparati e miscelati nell'eppendorf da 0.5 ml sono sottoposti ad uno dei seguenti cicli di amplificazione:

	Temperatura	Tempo	n° Cicli
Denaturazione iniziale	94°C	3 min	1
Denaturazione iniziale	94°C	1 min	24
Annealing	42°C	1 min	
Estensione	72°C	1 min	
Estensione Finale	72°C	10 min	1

Al termine del primo ciclo di PCR nella provetta vengono aggiunti l'oligonucleotide con alta T_m (100 pmoli), la miscela di dNTP (200 μ M) e altre 2.5 unità dell'enzima *DyNAzyme EXT* DNA-polimerasi. I reagenti vengono miscelati nella provetta insieme all'amplificato e se necessario si centrifuga per depositarli sul fondo.

Si dà inizio quindi al secondo ciclo di PCR :

	Temperatura	Tempo	n° Cicli
Denaturazione iniziale	94°C	3 min	1
Denaturazione iniziale	94°C	1 min	24
Annealing	60°C	1 min	
Estensione	72°C	1 min	
Estensione Finale	72°C	10 min	1

Il gene amplificato, e anche mutato, viene digerito con gli opportuni enzimi di restrizione e clonato in un vettore di espressione trattato con gli stessi enzimi.

2.2. Clonaggio

2.2.1. Idrolisi catalizzata da enzimi di restrizione

Per allestire una reazione di idrolisi con endonucleasi di restrizione, una quantità nota di DNA da digerire è incubata con l'enzima (5U per μ g di DNA), in presenza di un tampone adatto all'enzima scelto. La reazione è condotta ad una temperatura ottimale per almeno 2 h.

2.2.2.Elettroforesi di DNA su gel di agarosio

L'elettroforesi di DNA consente di separare i frammenti nucleotidici in base al loro peso molecolare ed alla forma topologica in cui si presentano. I campioni da sottoporre alla corsa elettroforetica sono preparati aggiungendo al DNA un opportuno volume di *Loading Dye*. La corsa è condotta nel tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) ad un voltaggio costante di 100 V e le bande sono rivelate con luce ultravioletta grazie alla presenza di bromuro di etidio (0.5 µg/ml) nel gel di agarosio. Come riferimento per i pesi è caricato sul gel un opportuno marcatore.

2.2.3.Estrazione e purificazione di DNA da gel

Il DNA d'interesse è sottoposto alla corsa elettroforetica su gel di agarosio; la banda relativa al frammento di DNA da purificare è visualizzata con luce ultravioletta a bassa frequenza ed estratta da gel. Il protocollo di purificazione è condotto con il *QIAquick Nucleotide Removal kit* della QUIAGEN che prevede la solubilizzazione del DNA a 50°C, la sua precipitazione su una resina opportuna, il lavaggio e infine l'eluizione, il tutto in adeguati tamponi forniti dalla casa produttrice.

2.2.4.Reazione di ligasi

Si utilizza l'enzima DNA ligasi, che catalizza la formazione del legame fosfodiesterico tra un gruppo fosfato all'estremità 5' ed un gruppo ossidrilico all'estremità 3' del DNA. La reazione viene effettuata utilizzando un *kit* della NOVAGEN. Il DNA da ligare viene incubato con l'enzima DNA ligasi del fago T4 (1U/100 ng di plasmide), con ATP 1 mM, DTT 1 mM e con un tampone opportuno fornito nel *kit* stesso , a 16°C per una notte (12-16 ore).

2.2.5.Preparazione cellule competenti

Una piccola aliquota di uno stab in glicerolo del ceppo cellulare di *E.coli* di interesse è stata strisciata su piastra di LB/agar ed incubata a 37 °C per una notte. Una delle colonie cresciute sulla piastra è stata inoculata in 10 ml del mezzo liquido Luria-Bertani/Miller “LB”, costituito dall’1% di NaCl, 1% di Tryptone e 0.5% di estratto di lievito, e incubata a 37 °C, sotto agitazione per tutta la notte. 200 µl di questo preinoculo sono stati diluiti in 20 ml di brodo LB, in una beuta sterile e incubati a 37 °C sotto agitazione finché la coltura non ha raggiunto un valore di crescita di 0.6 O.D./ml. A questo punto la coltura è stata centrifugata per 5' a 2700 g a 4 °C.

I pellet cellulari sono stati risospesi in 5 ml di MgCl₂ 0.1 M freddo e ricentrifugati nelle stesse condizioni. Il procedimento è stato ripetuto utilizzando 10 ml di CaCl₂ 0.1 M e raffreddando la soluzione 60' in ghiaccio prima di centrifugarla. Infine il pellet cellulare è stato risospeso in 7 ml di una soluzione sterile di CaCl₂ 0.1 M in glicerolo 15%. La sospensione cellulare è stata, infine, divisa in piccole aliquote (300 µl) congelate rapidamente in miscela frigorifera e conservate a –80 °C.

2.2.6.Trasformazione chimica

Ogni aliquota di cellule batteriche, di circa 300 µl, viene mescolata con il DNA plasmidico, si fanno raffreddare per 30' in ghiaccio, riscaldare per 90" a 42°C e poste nuovamente in ghiaccio per 2'. A questo punto si aggiunge 1 ml di brodo LB e si incuba la coltura a 37°C su piastra agitante per circa 1h. La coltura è poi piastrata su terreno LB/Ampicillina (100 µg/ml) e incubata a 37°C per una notte per consentire la selezione dei soli batteri trasformati.

2.2.7.Preparazione di DNA plasmidico in piccola scala (minipreparazione)

3.0 ml di una coltura liquida satura del batterio trasformato con il plasmide d'interesse sono centrifugati a 6000 rpm per 5' a temperatura ambiente. Il plasmide

viene isolato dal pellet di cellule utilizzando il *QIAprep Spin Miniprep kit* della QIAGEN.

Le cellule batteriche sono lisate in condizioni alcaline, il lisato è successivamente neutralizzato e modificato nella concentrazione salina per poter permettere la purificazione del plasmide su colonnine che vengono fornite nel kit stesso insieme ai tamponi necessari per tutti i passaggi.

2.2.8. Preparazione campione per sequenza

Le minipreparazioni di DNA ci consentono di ottenere il nostro plasmide in una soluzione di Tris-EDTA, dalla quale deve essere precipitato, qualora, come nel nostro caso, si debba inviare il campione per il sequenziamento ad una ditta esterna.

La precipitazione è effettuata in una miscela di etanolo al 70% e di acetato di ammonio 0.18 M. La miscela è lasciata a temperatura ambiente per 1 h e centrifugata a 13000 rpm per 15'. Il pellet è lavato con etanolo al 70% per eliminare i sali presenti ed è quindi asciugato e pronto per essere spedito.

2.3. Espressione e purificazione delle proteine

2.3.1. Derivato monomerico

Il primo passo dell'espressione è la trasformazione del ceppo di *E.coli* BL21(DE3) con due quantità diverse (10 e 100 ng) di plasmide contenente l'inserto codificante la proteina di interesse. La trasformazione viene fatta seguendo il protocollo descritto nel precedente paragrafo. Una colonia cresciuta su piastra è inoculata a 37°C per una notte in 50 ml di brodo LB contenente anche 100 mg/l di ampicillina onde consentire la crescita delle sole cellule trasformate e quindi resistenti all'antibiotico. L'indomani la coltura è diluita 1:100 (V/V) in 2 litri di terreno fresco, in beuta sterile, sotto agitazione ed ossigenazione.

Per migliorare la resa nella maggior parte dei casi la crescita batterica viene eseguita nel mezzo liquido “Terrific Broth” (TB), costituito dall' 1.2% di Tryptone, 2.4% di estratto di lievito, 4% (V/V) di glicerolo, 0.231% KH_2PO_4 e 1.254% di K_2HPO_4 . Quando l'assorbanza, a 600 nm, raggiunge un valore pari a 3.0 O.D. viene attivata l'espressione mediante l'aggiunta di una soluzione acquosa di isopropil- β -tiogalattopiranoside (IPTG) 100 mM fino ad una concentrazione finale 0.4 mM. L'IPTG induce il promotore del gene dell'RNA polimerasi di T7, posto, nel plasmide, a monte dell'inserto genico da esprimere. L'espressione viene lasciata per tre ore, poi le cellule vengono suddivise in quattro aliquote e raccolte mediante centrifugazione a 6000 RPM a 4°C. Ciascuna aliquota è risospesa in 15 ml di una soluzione tampone costituita da TRIS-HCl 50 mM a pH=8.4, e contenente 5 mM EDTA. Le cellule sono lisate mediante ultrasuoni con un apparecchio Microson Ultrasonic Homogenizer XL2000, operante alla potenza massima di 10 W, usando cicli intermittenti (30” ON e 30” OFF) per un totale di 20 minuti, con il campione immerso in un bagno di ghiaccio. Dopo la lisi delle cellule la proteina, sequestrata nei corpi di inclusione, viene solubilizzata con una soluzione di Tris-HCl 0.1 M pH 8, Triton X100 2%, Urea 2 M, EDTA 10 mM e sottoposta a vari processi di sonicazione. Dopo centrifugazione a 12500 RPM i corpi inclusi, ormai contenenti solo la proteina, vengono risospesi in un agente denaturante: Tris-HCl 0.1 M pH 8.4, EDTA 10 mM, Guanidina 6 M. Viene poi aggiunto un reagente tiolico, ditiotreitolo (DTT) 1 M, per ridurre completamente i ponti disolfurici. La riduzione viene effettuata ad una concentrazione finale di DTT 25 mM, sotto azoto a 37°C per tre ore. Dopo l'allontanamento del DTT in eccesso mediante dialisi in acido acetico 20 mM, la proteina è riossidata in tampone Tris-HCl 0.1 M pH 8.4, in presenza della coppia redox glutatione ridotto (3 mM)/glutatione ossidato (0.6 mM) sotto azoto per venti ore. Avendo la soluzione un volume troppo grande per lo step successivo viene concentrata mediante ultrafiltrazione su AMICON utilizzando una membrana YM3 con limite di esclusione di 3000 Da. L'ultimo stadio della purificazione consiste in una cromatografia su Sephadex G-75 utilizzando come tampone per l'eluizione

acetato di ammonio 0.1 M pH 5.65, che ci consente di ottenere il monomero separato sia dal dimero eventualmente presente, sia dalle altre impurezze. La proteina così ottenuta è costituita prevalentemente da monomeri in cui le Cys 31 e 32, responsabili dei ponti disolfurici intersubunità, formano dei disolfuri con il glutatione. La sua concentrazione è determinata mediante lettura UV a 280 nm (mBS-RNasi $\epsilon=0.5$ ml mg⁻¹ cm⁻¹; BS-RNasi $\epsilon=0.465$ ml mg⁻¹ cm⁻¹; RNasi A $\epsilon=0.695$ ml mg⁻¹ cm⁻¹).

2.3.2. Riduzione selettiva

Effettuando una riduzione in condizioni controllate è possibile fare in modo da ridurre solo i ponti disolfurici che coinvolgono le cisteine 31 e 32 (D'Alessio et al., 1975). La proteina liofilizzata viene sciolta in tampone Tris/Acetato 0.1 M pH 8.4 in modo che la sua concentrazione finale sia circa 1 mg/ml. La riduzione viene effettuata con DTT in rapporto molare [DTT]/[Proteina] pari a 10/1 a temperatura ambiente per circa 20 minuti in ambiente saturo di azoto (D'Alessio et al. 1975). La proteina con le due cisteine libere può essere o alchilata o utilizzata in forma ridotta per la dimerizzazione.

2.3.3. Alchilazione del monomero con Iodoacetammide

Per alcuni esperimenti è stato necessario rimuovere il glutatione e bloccare il gruppo tiolico con iodoacetammide (IAA).

Una volta effettuata la riduzione selettiva si procede con l'alchilazione con IAA in rapporto molare [IAA]/[Proteina] = 100/1, al buio per 1 ora a temperatura ambiente. Si allontanano le impurezze con cromatografia su Sephadex G-75 utilizzando come tampone di eluizione acetato di ammonio 0.1 M pH 5.5. Le frazioni contenenti la proteina vengono riunite e liofilizzate.

La purezza del campione è controllata mediante SDS-PAGE e ES-MS. Gli spettri di massa sono stati eseguiti presso il laboratorio del prof. P. Pucci del Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

2.3.4.Dimerizzazione

E' necessario partire dalla proteina con le due cisteine 31 e 32 bloccate con glutatione ed effettuare una riduzione selletiva dei ponti disolfurici. L'eccesso di DTT è allontanato per dialisi con Tris/Ac 0.1 M pH=8.4: è durante questo passaggio che si ha anche la riossidazione all'aria della proteina. Dopo la dialisi il campione viene concentrato mediante ultrafiltrazione su AMICON (membrana YM3) e purificato mediante gel-filtrazione su Sephadex G-75: come tampone di eluizione si utilizza acetato di ammonio 0.1 M a pH 5.65.

2.3.5.Preparazione dei dimeri in condizioni denaturanti della RNasi A

La procedura della dimerizzazione in condizioni non fisiologiche ha una origine abbastanza remota ma facilmente riproducibile (Crestfield et al., 1962).

Il monomero è sciolto in una soluzione di acido acetico al 40%, ad una concentrazione pari a 5 mg/ml, lasciato per 1 ora a temperatura ambiente, congelato rapidamente e liofilizzato per la notte.

Il liofilizzato viene ripreso con un tampone sodio fosfato 0.2 M pH 6.7 e cromatografato per separare i prodotti.

2.3.6.Dimeri non covalenti della BS-RNasi (NCD)

Per la preparazione del dimero NCD si parte da BS-RNasi all' equilibrio (MXM/M=M, 70/30), la proteina si riprende in tampone Tris/Acetato 0.1 M pH 8.4 tale che la concentrazione proteica finale sia circa 1 mg/ml. Si riducono i ponti disolfurici con DTT e successivamente si procede con l' alchilazione con IAA (la riduzione e l' alchilazione sono state precedentemente spiegate). Si procede con cromatografia su Sephadex G-75 utilizzando come tampone di eluizione acetato di ammonio 0.1 M pH 5.65, o sodio fosfato 0.2 M pH 6.7. La specie dimerica non covalente della BS-RNasi, con le cisteine 31 e 32 di entrambe le subunità legate ad

IAA, si ottiene a partire dal dimero scambiato, mentre la forma non scambiata della proteina iniziale verrà trasformata in un monomero, anch' esso con le cisteine 31 e 32 legate a due molecole di IAA.

2.3.7. Saggi di attività: saggi Kunitz

L'attività delle ribonucleasi ottenute è stata determinata con il metodo di Kunitz (Kunitz, M., 1946), che viene effettuato su RNA da lievito sciolto in sodio acetato 0.1 M pH 5.5, alla concentrazione di 0.5 mg/ml. Quantità diverse di enzima vengono aggiunte a 1 ml di RNA e si misura la diminuzione di assorbanza a 300 nm dovuta all'idrolisi dell'RNA stesso. L'attività specifica viene espressa in unità / mg di proteina usando la formula:

$$\text{Attività} = \Delta A \cdot t^{-1} (\text{Volume}_{\text{enzima}} / \text{Volume}_{\text{tot}}) / [C_{\text{enzima}} (A_0 - A_f)]$$

$\Delta A \cdot t^{-1}$ = la variazione di assorbanza in 1 minuto.

C_{enzima} = concentrazione dell'enzima, espressa in mg/ml

A_0 = valore dell'assorbanza al tempo zero

A_f = valore dell'assorbanza a tempo infinito

Il valore $A_0 - A_f$ risulta solitamente pari a 0.2 per le ribonucleasi monomeriche e 0.18 per quelle dimeriche.

2.4. Caratterizzazione strutturale

Tutte le caratterizzazioni sono state effettuate in soluzione, sulle proteine allo stato monomero e con i residui di cisteina 31 e 32 legati a due molecole di glutatone.

2.4.1. Misure CD

Gli spettri CD sono stati registrati con un'apparecchio Jasco J-715 equipaggiato con un controllo della temperatura tipo Peltier (Model PTC-348WI). L'ellitticità molare per ogni residuo, $[\theta]$ in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, è stata calcolata dall'equazione: $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} \cdot \text{mrw} / 10 \cdot l \cdot C$, dove $[\theta]_{\text{obs}}$ è l'ellitticità misurata, mrw è il peso molecolare medio di ogni residuo, (117 Da per la BS-RNasi e 110.5 Da per la RNasi A), C è la concentrazione della proteina in g L^{-1} e l è la lunghezza ottica della cella in cm. Sono state usate celle da 0.1 cm, concentrazione di proteina di circa 0.3 mg mL^{-1} , e gli spettri sono stati registrati utilizzando i seguenti parametri:

- Start WL: 260 nm
- End WL: 190 nm
- Step Resolution: 0.2 nm
- Speed: 20 nm/min
- Accumulations: 3
- Response: 16
- Band width: 2.0 nm
- Sensitività: 50 mdeg

La linea di base degli spettri è corretta mediante sottrazione dello spettro del solo tampone. I valori percentuali delle strutture secondarie sono stati calcolati con il programma di deconvoluzione K2D (Andrade et al., 1993; Lobley et al., 2002).

Le curve di denaturazione termica sono state registrate nella modalità temperature scan a 222 nm da 25 a 85 °C con uno scan rate di 1.0 K min^{-1} .

2.4.2. Misure NMR

Le misure sono effettuate su spettrometri Bruker DRX operanti a 400, 500 e 600 MHz per il protone, alla temperatura di 300 K. Spettri monodimensionali e bidimensionali, di tipo TOCSY e NOESY, sono ottenuti usando i programmi di impulsi del software standard della Bruker; Tali spettri sono stati processati con il

programma NMRPIPE (Delaglio et al, 1995) e visualizzati con il programma NMRVIEW (Johnson and Blevins 1994).

2.5. Analisi dell'interconversione

2.5.1. Cromatografia FPLC

Lo studio della cinetica di scambio è stato effettuato incubando le forme pure (scambiata o MxM e non scambiata o M=M) delle proteine dimeriche per diversi giorni e analizzando delle aliquote. Tale procedura prevede la valutazione quantitativa sia del monomero che del dimero presenti dopo riduzione selettiva del campione: il dimero scambiato (MxM) verrà eluito come dimero non covalente mentre quello dove non è presente lo scambio (M=M), verrà scisso nei suoi due componenti monomerici. E' stato utilizzato il sistema cromatografico FPLC System della Pharmacia Biotech sul quale abbiamo montato una colonna preimpaccata Superdex 75 HR 10/30. Questo sistema utilizza il principio della gel-filtrazione consentendoci una buona risoluzione e tempi più ristretti. La colonna ha un volume di 24 ml e consente la separazione di molecole con peso molecolare compreso tra 3000 e 70000 Da. La quantità di campione da caricare sulla colonna per avere una buona risoluzione è di circa 50 µg, utilizzando come tampone per l'eluizione acetato d'ammonio 50 mM pH 5.0 + NaCl 0.3 M. I parametri utilizzati durante le varie cromatografie effettuate sono:

- Flusso: 0.6 ml/min
- Carta: 5 mm/min
- AU: 0.01 (a 280 nm)

L'area dei picchi corrispondenti al monomero (M=M) e al dimero (MXM) è un indice diretto delle quantità delle due isoforme presenti nella miscela.

2.5.2. **Tecnica del "Cross-Linking"**

Oltre che con la tecnica cromatografica, una stima dell'interconversione è ottenuta attraverso la reazione di "cross-linking" con il divinil-sulfone (DVS); quest'ultimo ha la capacità di interagire con il sito catalitico della BS-RNasi, mimando il comportamento del gruppo fosfato dell'acido ribonucleico (Ciclig et al., 1998). In particolare il DVS lega covalentemente le istidine 12 e 119, che svolgono un ruolo fondamentale nella reazione di idrolisi dell'RNA. Se il sito catalitico è misto, come nel caso del dimero scambiato, il risultato di questa reazione è un legame covalente tra l'elica N-terminale di ciascuna subunità ed il corpo dell'altra; la proteina ottenuta risulterà quindi dimerica anche in condizioni riducenti e denaturanti. Viceversa la reazione della forma non scambiante legherà l'estremità N-terminale di ciascuna subunità al proprio corpo, e di conseguenza la proteina migrerà come monomero in ambiente riducente e denaturante. Nel protocollo standard a 40 µg di proteina, con una concentrazione di 0.3 mg/ml, vengono aggiunti 3 µl di DVS (al 10% in etanolo) e vengono portati a 100 µl totali con NaAc 100 mM a pH = 5.5; in queste condizioni abbiamo un eccesso di DVS per ciascuna subunità di proteina. Tale soluzione viene incubata a 30°C e aliquote di 25 µl vengono prelevate dopo 24, 48 e 72 ore. La reazione viene interrotta con β-mercaptoetanolo (concentrazione finale 200 mM), incubata per 15-20 min a temperatura ambiente e caricata su SDS-PAGE in condizioni riducenti. Dopo decolorazione del gel è possibile effettuare una stima qualitativa delle isoforme MXM (dimero) e M=M (monomero) presenti all'equilibrio. La reazione richiede tempi lunghi per giungere a completezza, quindi non può essere utile per seguire la cinetica di scambio, ma rispecchia la stessa composizione all'equilibrio attraverso un metodo indipendente dalla reattività delle cisteine (Ciglic et al., 1998).

2.5.3. **Gel nativi**

Se si vogliono separare delle proteine, non solo in base alle dimensioni, ma anche in base alla carica e alla conformazione si usa la tecnica detta native-Page, che è simile

alla SDS-Page, ma non prevede l'uso né di agenti denaturanti come l'SDS né di riducenti come il β -mercaptoetanolo. Questa tecnica permette di studiare la composizione e la struttura di proteine native, specialmente quando si vuole preservarne l'attività per ulteriori studi o per il rilevamento.

La tecnica native-Page è l'ideale sia per separare su gel le isoforme dimeriche della BS-RNasi, sia i due dimeri della RNasi A che si hanno in seguito alla liofilizzazione da acido acetico. Il gel utilizzato ha un pH acido.

Sul gel devono essere caricati minimo 5 μ g di proteina. Per evitare la denaturazione della proteina per riscaldamento, prodotto dall'effetto Joule, la corsa elettroforetica è effettuata a $T=4^\circ\text{C}$ a $V=35$ Volt.

In alcuni casi per apprezzare una migliore separazione delle bande la corsa è stata fatta a 4°C , ad un voltaggio pari a 25 volt per un tempo di 16 ore e 30 minuti.

Le bande sono evidenziate mediante colorazione in soluzione acquosa allo 0.25% di Brilliant Blue Comassie, 25% di isopropanolo e 10% di acido acetico glaciale per circa 30 minuti e decolorazione in soluzione acquosa di acido acetico glaciale 7% e metanolo tecnico 20%, per un tempo sufficiente per la visualizzazione delle bande.

2.5.4. Dissociazione termica delle proteine

I dimeri dalla liofilizzazione da acido acetico al 40% dei corrispondenti monomeri, sono stati dializzati in tampone Tris/Cl 50 mM pH 7.3 / NaCl 0.13 M e incubati a 37°C per misurarne il tempo di dissociazione. Si è valutata la percentuale di forma dimerica nel tempo, per pesata, del relativo picco.

Riportando in grafico il logaritmo della percentuale di dimero presente del campione incubato in funzione del tempo, mi è stato possibile determinare il tempo di dimezzamento.

Per tutte le proteine esaminate si è osservato che i campioni conservati a 4°C hanno una stabilità estremamente elevata, mostrando solo una dissociazione di lieve entità anche dopo alcuni mesi.

2.6. DATI CRISTALLOGRAFICI

Le strutture cristallografiche dei due dimeri scambianti dei mutanti P19A-BS-RNasi e *h4*-BS-RNasi sono stati ottenuti in collaborazione con il gruppo del prof. Mazzeella. I cristalli, ottenuti partendo dalle due miscele all'equilibrio, presentano una morfologia molto simile e sono isomorfi rispetto alla proteina nativa cristallizzate in condizioni molto simili (PDB Code 1R5D).

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1. Preparazione e caratterizzazione dei derivati monomerici

I derivati monomerici della BS-RNasi con le cisteine 31 e 32 bloccate con due molecole di glutatione e il mutante della RNasi A, sono espressi nel ceppo di *E.Coli* BL21(DE3), utilizzando il protocollo di espressione e purificazione descritto nel capitolo precedente per la proteina nativa, in quanto anche in questo caso la proteina mutata precipita nei corpi di inclusione, dai quali viene solubilizzata in forma ridotta e denaturata. La proteina è stata poi rinaturata e purificata come monomero mediante gel-filtrazione ottenendo una resa di espressione di circa 20 mg per litro di coltura batterica. La purezza dei campioni ottenuti è stata verificata mediante SDS-Page e spettrometria di massa.

Ciascuna variante preparata ha mostrato una capacità di degradare l'RNA simile a quella del corrispondente derivato monomerico con sequenza nativa, indicando un corretto folding dei siti catalitici. Altra prova del corretto ripiegamento dei mutanti monomerici si è ottenuta dagli spettri di dicroismo circolare che mostrano un andamento molto simile tra di loro e la cui deconvoluzione tra 190 e 240 nm ha dato una percentuale di α -elica, β -sheet e random coil molto simile per tutte le proteine, in buon accordo con le percentuali di struttura secondaria derivate dalla struttura NMR di mBS, la forma monomerica di BS-RNasi (Avitabile et al., 2003).

La stabilità termica delle proteine è stata valutata misurando le curve di denaturazione termica al CD. In fig. 3.1. è riportata la frazione foldata, calcolata come $(\theta_{\text{misurato}} - \theta_{\text{denaturato}}) / (\theta_{\text{foldato}} - \theta_{\text{denaturato}})$ a 222 nm, in funzione della temperatura, per tutti i mutanti realizzati e per mBS e RNasi A. La tabella 3.1.

riporta invece i valori di T_m , calcolati mediante una analisi di regressione lineare dei dati sperimentali.

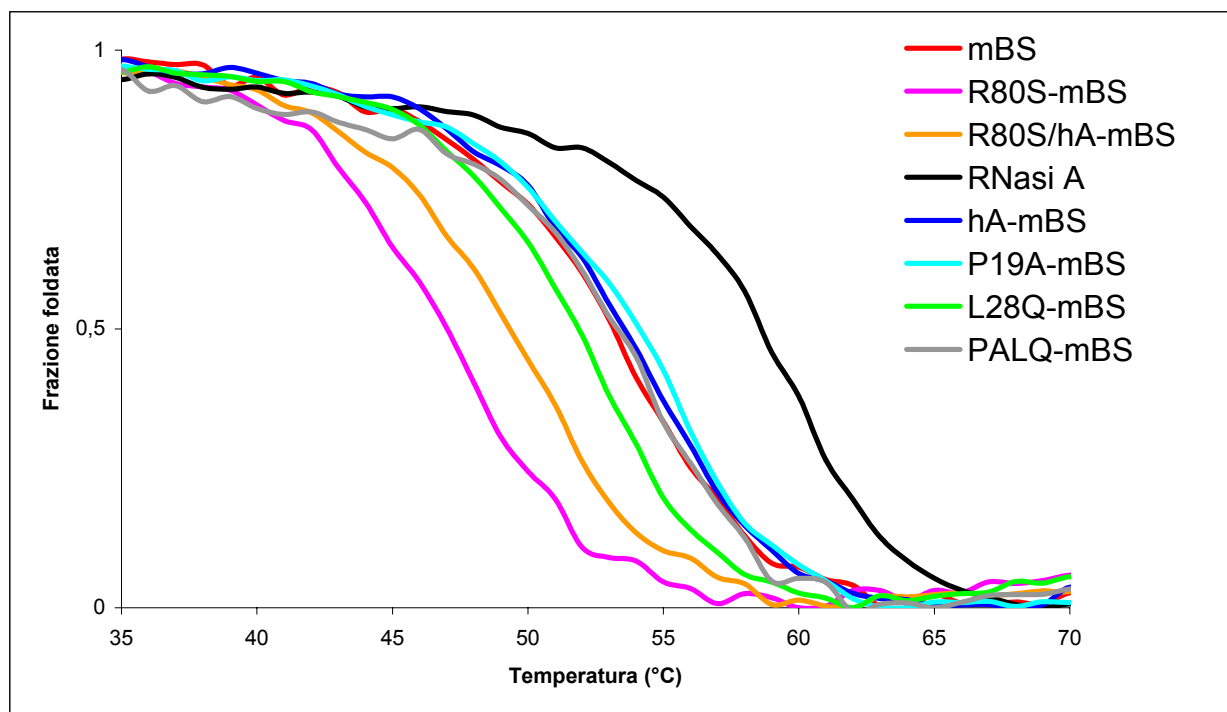


Figura 3.1.: Curve di denaturazione termica misurate al CD in un intervallo di temperatura tra 35°C e 70°C.

Tab. 3.1.: Temperature di denaturazione misurate al CD.

Proteina	T_m
mBS	53,0 °C
RNasi A	61,0 °C
P19A-mBS	55,0 °C
L28Q-mBS	53,0 °C
PALQ-mBS	53,0 °C
hA-mBS	53,5 °C
R80S-mBS	49,0 °C
R80S/hA-mBS	47,0 °C

L'introduzione della sola Pro19 in mBS induce una piccola ma significativa stabilizzazione ($T_m=55.0^{\circ}\text{C}$) mentre la sostituzione della Leu28 con una Glu sia nel

mutante singolo (L28Q-mBS) sia in quello doppio (PALQ-mBS) non induce differenze significative ($T_m=53.0^{\circ}\text{C}$).

La sostituzione in mBS dell'intera regione cerniera con quella della RNasi A (*hA*-mBS) non altera la stabilità termica del mutante rispetto alla proteina nativa mentre l'introduzione della sola serina in posizione 80 abbassa il valore di T_m di 6°C . Questo potrebbe essere semplicemente un effetto dovuto alla rimozione di un residuo carico dalla superficie esposta al solvente. D'altro canto l'incremento della stabilità termica di circa 2°C del mutante R80S/*hA*-mBS rispetto al singolo mutante (R80S-mBS) può essere dovuto al fatto che molto probabilmente Ser80 ricostituisce lo stesso legame a idrogeno con Ser18 che contribuisce alla stabilizzazione della conformazione dell'*hinge* della RNasi A.

3.2. NMR

Gli spettri NMR monodimensionali di tutti i derivati monomerici preparati mostrano i segnali caratteristici di mBS conservati nelle medesime posizioni indicando un corretto ripiegamento di tutti i mutanti. Onde poter osservare più accuratamente l'effetto di ogni singola mutazione sono stati analizzati gli spettri NMR 2D dei vari mutanti che come gli spettri monodimensionali confermano il corretto ripiegamento delle proteine preparate ma mostrano alcune differenze soprattutto nelle regioni mutate.

Dal confronto fra lo spettro COSY di P19A-mBS e PALQ-mBS con quello di mBS è possibile osservare, nella regione caratteristica delle alanine, la comparsa di un segnale dovuto ad un interazione $C_{\alpha}\text{H}-C_{\beta}\text{H}_3$ dovuta all'Ala19. Lo stesso risultato è stato ottenuto anche nello spettro TOCSY, dove si può osservare anche la comparsa di un altro segnale corrispondente all'interazione $\text{NH}-\text{CH}_3$ caratteristica di questo residuo (fig. 3.2.). Analogamente, negli spettri di L28Q-mBS e PALQ-mBS è possibile osservare la scomparsa dei picchi corrispondenti alla Leu28, mentre

l'individuazione dei segnali di Glu28 risulta più difficoltosa a causa della sovrapposizione con altri segnali.

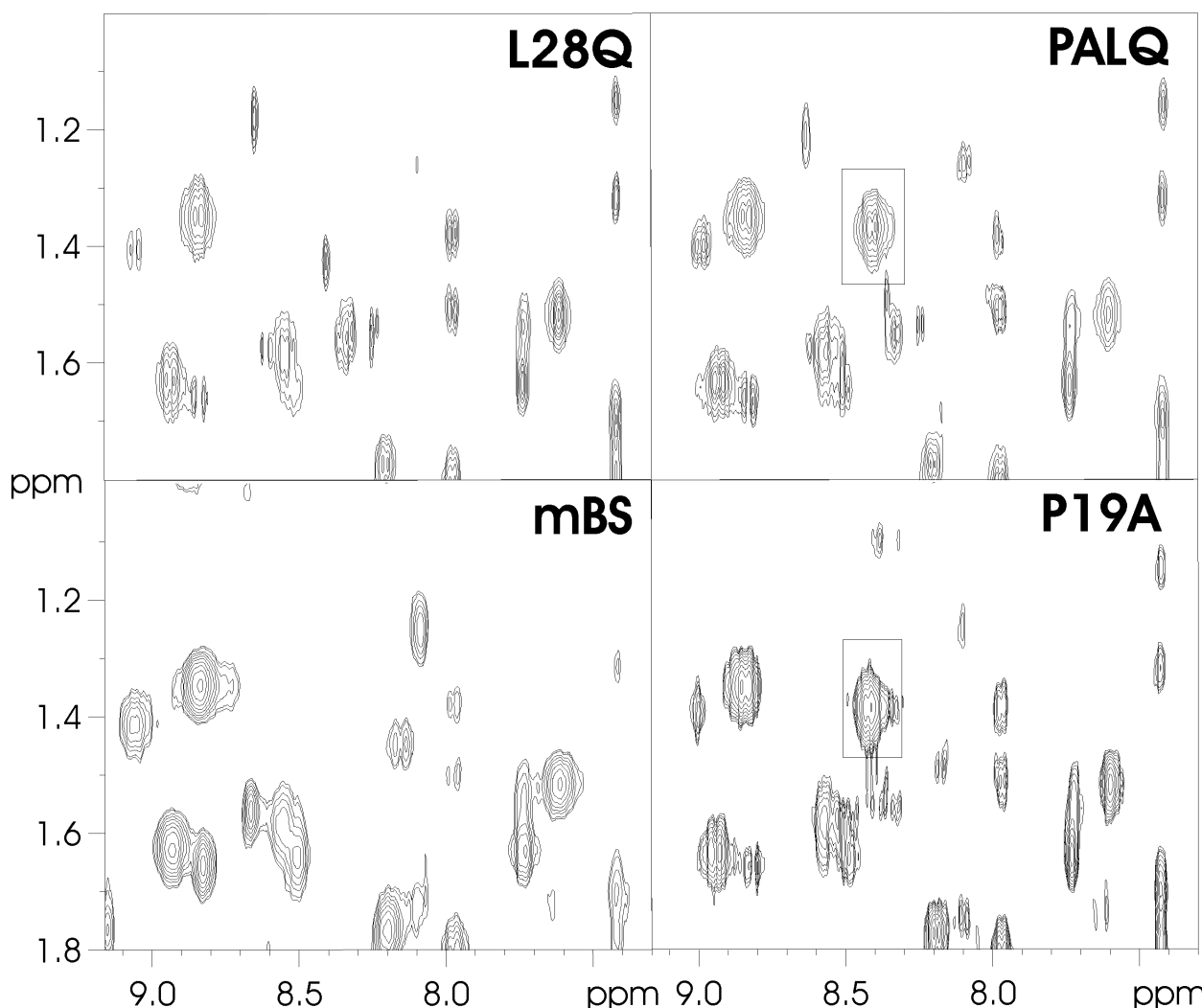


Figura 3.2.: Particolare dello spettro 2D TOCSY di L28Q-mBS (pannello L28Q), PALQ-mBS (pannello PALQ), mBS (pannello mBS) e P19A-mBS (pannello P19A). Nel pannello di P19A e PALQ è evidenziato il cross-peak dell'Ala19.

E' interessante osservare che in entrambi gli esperimenti i segnali appartenenti all'Ala19 sono decisamente slargati, suggerendo la presenza di un equilibrio lento tra differenti conformazioni dell'*hinge* (tratto 16-22).

Oltre a fornire indicazioni sul corretto folding dei mutanti, l'analisi qualitativa degli spettri NMR può fornire indicazioni sulla conformazione locale. Variazioni della struttura primaria, secondaria e terziaria, dovuti ad esempio a mutazioni puntuali, possono causare spostamenti più o meno considerevoli dei chemical shifts dei segnali dei residui interessati o prossimi alla mutazione.

Infatti per il mutante *hA*-mBS la sovrapposizione dello spettro TOCSY con quello di mBS mette in evidenza che molte delle risonanze sono coincidenti, confermando il corretto folding della proteina, ma osservando una regione espansa di questo spettro, riportata in fig. 3.3., è evidente la presenza di tre nuovi contatti NH-CH₃ nello spettro di *hA*-mBS (rosso), assegnati come Thr17, Ala19 e Ala20.

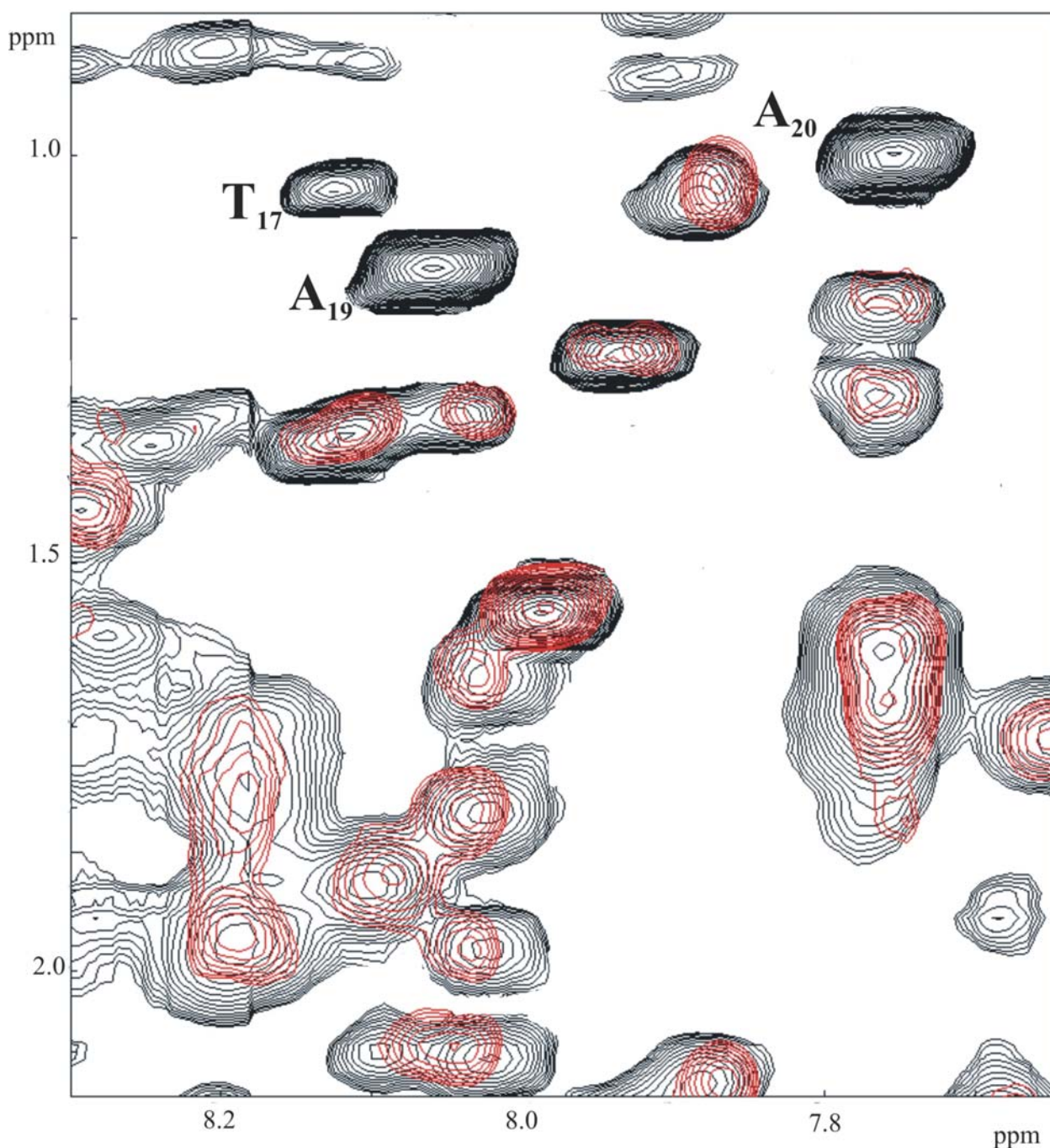


Figura 3.3.: Regione dello spettro 2D TOCSY di mBS (nero) e *hA*-mBS (rosso).

L'analisi dei contatti sequenziali nello spettro NOESY ha permesso l'assegnazione protonica di tutti i sistemi di spin dei residui dell'*hinge*, riportati in tab. 3.2. La tabella riporta per confronto le risonanze protoniche di mBS e di RNasi A (Avitabile et al., 2003). Nonostante l'identità di sequenza i valori di chemical shift di *hA*-mBS mostrano una elevata differenza con quelli della RNasi, suggerendo una differente orientazione locale della regione cerniera nelle due proteine.

Tabella 3.2.. Assegnazione dei chemical shifts dei residui 15-21 di mBS, *hA*-mBS e RNasi A a pH 5.65, 300 K.

<i>n° residue</i>	mBS			S₁₆T₁₇A₁₉A₂₀-mBS					
15	Ser	NH	8.90	Ser	NH	8.94	Ser	NH	8.89
	Ser	HA	4.76	Ser	HA	4.24		HA	4.31
	Ser	HB1	3.79	Ser	HB1	3.87	Ser	HB1	3.96
	Ser	HB2	3.65	Ser	HB2	3.74	Ser	HB2	3.74
16	Gly	NH	8.59	Ser	NH	8.18	Ser	NH	8.02
	Gly	HA1	4.09	Ser	HA	4.27		HA	4.32
	Gly	HA2	3.87	Ser	HB1	3.76	Ser	HB1	n.d.
				Ser	HB2	3.69	Ser	HB2	n.d.
17	Asn	NH	7.98	Thr	NH	8.13	Thr	NH	7.46
	Asn	HA	4.63	Thr	HA	4.20*	Thr	HA	4.46
	Asn	HB1	2.64	Thr	HB	4.20*	Thr	HB	4.07
	Asn	HB2	2.58	Thr	MG2	1.04	Thr	MG2	0.96
18	Ser	NH	8.29	Ser	NH	8.75	Ser	NH	8.41
	Ser	HA	4.17	Ser	HA	4.38	Ser	HA	4.27
	Ser	HB1	3.63	Ser	HB1	4.05	Ser	HB1	
	Ser	HB2	3.58	Ser	HB2	4.00	Ser	HB2	
19	Pro	HA	4.18	Ala	NH	8.06	Ala	NH	7.56
				Ala	HA	4.02	Ala	HA	3.44
				Ala	HB1	1.14	Ala	HB1	
				Ala	HB2		Ala	HB2	

20	Ser	NH	8.28	Ala	NH	7.754	Ala	NH	
	Ser	HA	4.32	Ala	HA	3.881	Ala	HA	
	Ser	HB1	3.78	Ala	MB	1.004	Ala	MB	
	Ser	HB2	3.62						
21	Ser	NH	8.41	Ser	NH	8.30	Ser	NH	8.04
	Ser	HA	4.36	Ser	HA	4.47	Ser	HA	4.31
	Ser	HB	3.90	Ser	HB1	3.91	Ser	HB1	3.92
				Ser	HB2	3.78	Ser	HB2	3.88

Benché il peptide *hinge* della RNasi A risulti flessibile (Avitabile et al., 2003), la sua mobilità è aumentata in *hA*-mBS, indicando così che altre sostituzioni esterne all' *hinge*, come la Ser80 per Arg nella BS-RNasi, possono giocare un ruolo nel suo fissaggio nella RNasi A.

La verifica di questa ipotesi ha richiesto il confronto dei chemical shifts dello scheletro peptidico del mutante R80S/*hA*-mBS con quello di mBS e RNasi A, riportati in letteratura (Avitabile et al., 2003). Nonostante la grande somiglianza degli spettri ^1H - ^{15}N -HSQC, l'assegnazione dei segnali del mutante ha richiesto l'acquisizione di un set di esperimenti standard del tipo ^1H - ^{15}N -HSQC-TOCSY e ^1H - ^{15}N -HSQC-NOESY. Il paragone con le risonanze ^{15}N e ^1H di mBS e RNasi A indicano che, accanto al residuo 80, le regioni maggiormente toccate dalla mutazione sono il peptide *hinge* e il tratto di catena 46-50, cioè le due regioni che interagiscono con la catena laterale di Ser80 (nella RNasi A) e Arg80 (in mBS) rispettivamente. In fig. 3.4. è riportata la sovrapposizione degli spettri ^1H - ^{15}N -HSQC dei picchi corrispondenti a mBS (rosso), R80S/*hA*-mBS (verde) e RNasi A (blu) per i residui 15, 17 e 18 dell' *hinge*, 80, 46 e 49.

L'analisi delle regioni degli spettri riportate in fig. 3.4. dimostra chiaramente che l'introduzione della Ser in posizione 80 sposta sostanzialmente le risonanze del mutante R80S/*hA*-mBS rispetto a quelle di mBS rendendole sovrapponibili a quelle della RNasi A, non solo per l' *hinge*, ma anche per le altre regioni influenzate dalla

mutazione. In tab. 3.3. sono riportate le risonanze ^{15}N e ^1H ammidiche delle regioni 15-19 e 46-50 insieme a quelle di Ser80 per R80S/*hA*-mBS, mBS e RNasi A. Come risulta evidente dall'analisi dei dati riportati in tabella 3.3., l'intorno chimico del peptide *hinge*, della Ser80 e del tratto di catena 46-50 nel mutante R80S/*hA*-mBS è molto simile a quello della RNasi A, suggerendo una conformazione molto simile tra le due proteine.

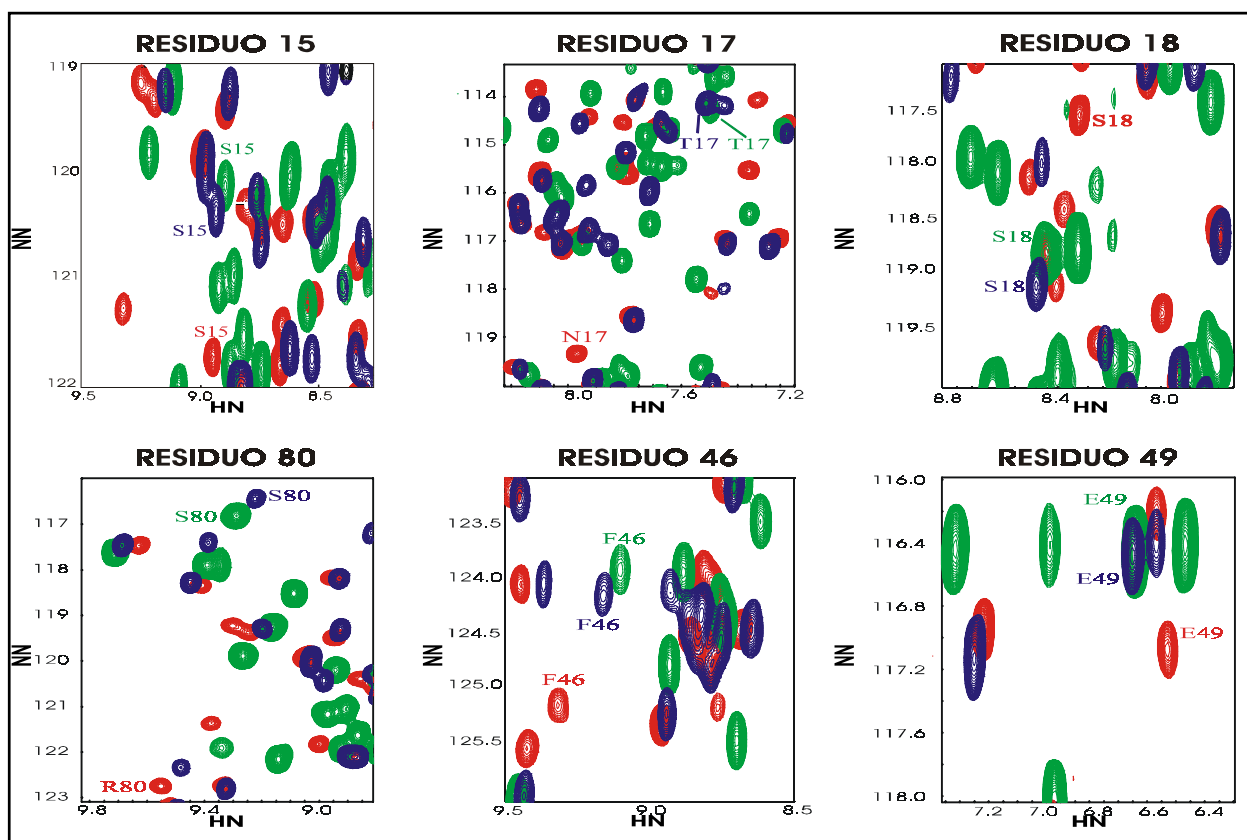


Figura 3.4.: Sovrapposizione degli spettri ^1H - ^{15}N -HSQC dei picchi corrispondenti a mBS (rosso), R80S/*hA*-mBS (verde) e RNasi A (blu) per i residui 15, 17 e 18 dell' *hinge*, 80, 46 e 49.

Tabella 3.3.. Assegnazione dei chemical shifts dei residui 15-19, 46-50 e 80 di mBS, R80S/*hA*-mBS e RNasi A a pH 5.65, 300 K.

<i>n° residuo</i>	mBS		R80S/ <i>hA</i> -mBS		RNase A	
15	Ser	HN 8.94	Ser	HN 8.93	Ser	HN 8.89
		N 121.83		N 120.43		N 120.19
16	Gly	HN 8.59	Ser	HN 8.05	Ser	HN 8.02
		N 111.72		N 116.45		N 116.22

17	Asn	HN 7.98 N 119.36	Thr	HN 7.49 N 114.12	Thr	HN 7.47 N 114.28
18	Ser	HN 8.29 N 117.57	Ser	HN 8.44 N 119.10	Ser	HN 8.41 N 118.80
19	Pro	HN - N -	Ala	HN 7.58 N 123.52	Ala	HN 7.56 N 123.57
46	Phe	HN 9.32 N 125.18	Phe	HN 9.16 N 124.15	Phe	HN 9.10 N 123.91
47	Val	HN 9.33 N 121.42	Val	HN 9.43 N 122.33	Val	HN 9.30 N 121.90
48	His	HN 8.76 N 125.27	His	HN 9.08 N 128.74	His	HN 9.04 N 129.18
49	Glu	HN 6.55 N 117.10	Glu	HN 6.68 N 116.46	Glu	HN 6.67 N 116.44
50	Ser	HN 9.59 N 117.47	Ser	HN 9.65 N 117.46	Ser	HN 9.67 N 117.62
80	Arg	HN 9.50 N 122.78	Ser	HN 9.17 N 116.43	Ser	HN 9.24 N 116.82

3.3. Analisi dell'interconversione

Una volta sicuri del corretto folding dei derivati monomerici siamo passati allo studio dei dimeri, e in particolare allo studio del fenomeno dell'interscambio delle estremità N-terminali. Tutte le proteine monomeriche sono sottoposte a riduzione selettiva con DTT per rimuovere le molecole di glutathione legate alle cisteine 31 e 32, riossimate all'aria e purificate mediante gel-filtrazione. Tutti gli step della dimerizzazione sono stati effettuati a 4°C, perché a questa temperatura l'interscambio di domini è estremamente rallentato (Piccoli et al. 1992).

La resa di dimerizzazione partendo dal monomero è dell'80% per BS-RNasi e per tutti i mutanti tranne che per quelli in cui la Leu 28 è stata sostituita con una Glu: nei

due mutanti L28Q-BS-RNasi e PALQ-BS-RNasi la resa si è abbassata al 50%. Questi risultati indicano che la Leu28 gioca un ruolo importante nel processo di dimerizzazione e sono in accordo con i dati ottenuti per alcuni varianti della RNasi A, che mostrano una più alta percentuale di dimero quando Gln28 è sostituita con Leu (Di Donato et al., 1994).

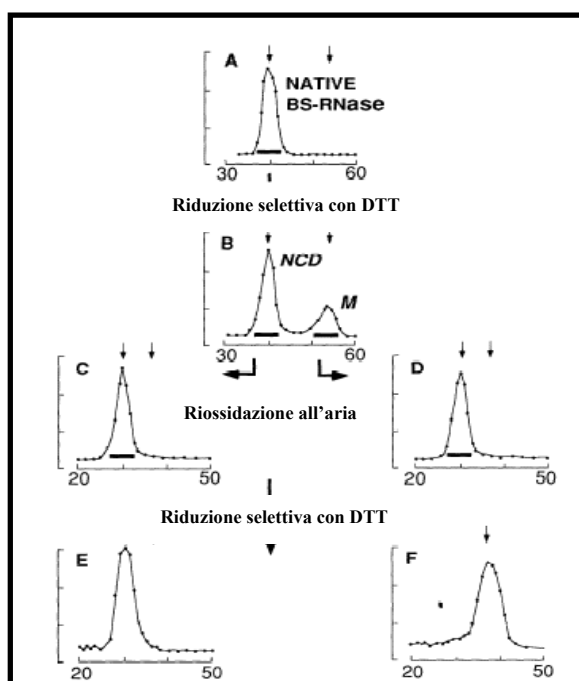
I dimeri ricombinanti così ottenuti sono costituiti prevalentemente dalla forma non scambiante (M=M), ma mostrano già una percentuale di scambio di circa il 10%. La valutazione della composizione all'equilibrio delle due isoforme è stata effettuata dopo incubazione del campione per circa 10 giorni a 37°C utilizzando l'esperimento di "cross-linking" con DVS descritto nel capitolo 2. Il metodo, che consente una valutazione su SDS-Page della composizione all'equilibrio delle due isoforme indipendente dalla reattività delle cisteine 31 e 32 (vedi riduzione selettiva capitolo 2), ha mostrato, per la BS-RNasi ricombinante che differisce dalla proteina nativa per la presenza della Met0 e per la mutazione N67D, una percentuale di MxM doppia rispetto a quella di M=M così come osservato per la proteina nativa. Tale rapporto è risultato alterato solo nei mutanti in cui sono stati sostituiti la Leu28 e l' Arg80: L28Q-BS-RNasi e PALQ-BS-RNasi hanno mostrato una composizione all'equilibrio tra MxM e M=M di 1/1, mentre nel mutante R80S/*hA*-BS-RNasi, in cui oltre alla sostituzione dell'intero *hinge* è abbinata la mutazione R80S, la composizione all'equilibrio è addirittura invertita rispetto alla proteina nativa mostrando un rapporto tra MxM e M=M di 1:2. Il mutante di controllo R80S-BS-RNasi contenente la singola mutazione R80S, invece non è in grado di alterare la composizione delle isoforme rispetto all'equilibrio della proteina nativa.

Lo studio della cinetica di scambio delle differenti ribonucleasi è risultato difficile con il metodo appena descritto in quanto la reazione con DVS richiede almeno 24 ore, un intervallo di tempo del tutto paragonabile con quello necessario allo scambio. Uno studio più accurato della velocità di scambio della coda N-terminale nei dimeri è stato effettuato mediante l'utilizzo del metodo introdotto da Piccoli et al. (1992) e descritto dettagliatamente nel capitolo precedente. Aliquote di proteina sono state

prelevate a tempi differenti dai campioni incubati a 37°C e sono state sottoposte a riduzione selettiva; le quantità relative delle due isoforme sono state valutate in base alla quantità di dimero e monomero eluite da una colonna cromatografica di gel-filtrazione.

Nello schema successivo (Piccoli et al., 1992) è riportata una semplificazione del metodo utilizzato per la valutazione delle due isoforme.

Anche questa tecnica ha confermato che a 37°C il fenomeno di scambio per la BS-RNasi ricombinante ha caratteristiche molto simili a quelle dell'enzima nativo, raggiungendo lo stesso rapporto 2:1 tra la forma scambiata e quella non scambiata nello stesso intervallo di tempo.



Schema 3.1.(Piccoli et al., 1992): Quando la BS-RNasi viene ridotta selettivamente, l'isoforma scambiata (MxM) viene eluita da gel-filtrazione come dimero non covalente (NCD), mentre l'isoforma scambiata (M=M) viene eluita come monomero (M). La conferma di ciò è che se NCD e M vengono riossidati all'aria e di nuovo ridotti selettivamente, il dimero proveniente dalla riossidazione di NCD verrà eluito ancora come dimero, mentre quello proveniente da M verrà eluito come monomero.

Sorprendentemente è stato osservato che la sostituzione della Pro19 e quella dell'intero *hinge* non avevano alcun effetto sulla composizione all'equilibrio delle due isoforme, in accordo con la stima qualitativa ottenuti dalla reazione con il DVS, l'unica differenza osservata riguardava un leggero incremento nel tempo di conversione.

La fig. 3.5., che riporta la composizione percentuale della miscela in funzione del tempo a 37°C, mostra chiaramente che in contrasto con ciò che succede mutando i residui dell' *hinge*, la sostituzione di Leu28 con Gln ha effetti significativi non solo sulla cinetica di conversione ma anche sulla composizione all'equilibrio di entrambi i mutanti L28Q-BS-RNasi e PALQ-BS-RNasi che raggiungono un plateau del 50% di MxM in accordo con i risultati ottenuti dagli esperimenti di cross-linking con il DVS.

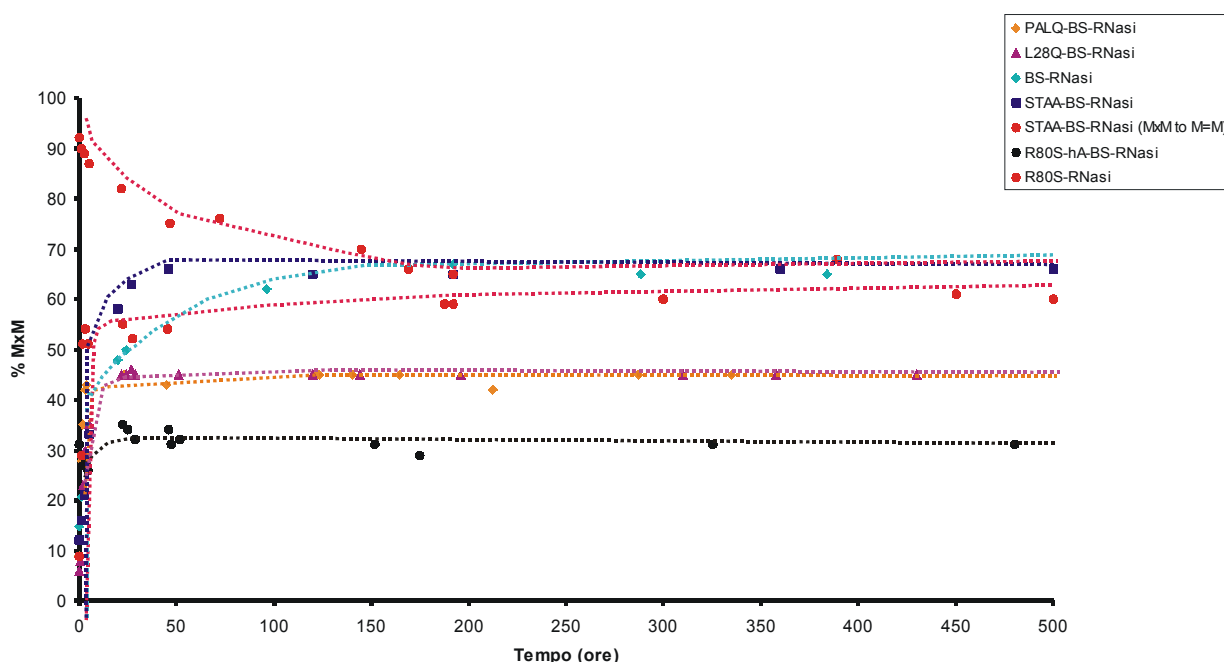


Figura 3.5.: Cinetica di interconversione $M=M \rightarrow MxM$ a 37°C.

L'effetto più vistoso è dato dal mutante R80S/*hA*-BS-RNasi che mostra rispetto alla proteina *w.t.* una percentuale delle due isoforme invertite: 30% di MxM e 70% di M=M mentre il mutante singolo R80S-BS-RNasi raggiunge all'equilibrio la stessa composizione della proteina nativa.

In accordo con i dati riportati da Piccoli et al. (1992) il processo di interconversione è bloccato a 4°C, lasciando la composizione della miscela inalterata per un tempo di almeno 1 mese. Per confermare il fatto che il processo fosse bloccato cineticamente è stata seguita la cinetica inversa cioè la conversione da MxM a M=M. In fig 3.5. a titolo di esempio è riportata la cinetica inversa per il mutante *hA*-BS-RNasi. Il grafico mostra anche in questo caso che la proteina raggiunge la stessa composizione all'equilibrio della proteina nativa.

3.4. Swapping in condizioni non fisiologiche

Lo scopo di questo studio è di valutare la propensione delle varie proteine monomeriche a nostra disposizione a formare aggregati in condizioni non-fisiologiche. Oltre che sul derivato monomerico della BS-RNasi e sul mutante *hA*-mBS già presentato in precedenza, lo studio è stato condotto sulla RNasi A e sul mutante in cui il peptide cerniera 16-22 dell'enzima pancreatico è stato mutato con il corrispondente tratto dell'enzima seminale.

Tutte le proteine monomeriche sono state sottoposte a liofilizzazione da acido acetico secondo il protocollo descritto nel capitolo precedente onde poter valutare la loro tendenza a dar luogo alla formazione di oligomeri così come avviene per la RNasi A (Crestfield et al., 1962). E' noto infatti che quando la RNasi A viene sottoposta a liofilizzazione da acido acetico dà luogo alla formazione di dimeri, trimeri e multimeri, alcuni dei quali sono stati caratterizzati strutturalmente (Liu et al., 1998; Liu et al., 2001).

Il primo approccio allo studio del fenomeno del *domain swapping* in condizioni non fisiologiche è stato verificare la riproducibilità dei dati riportati in letteratura sulla RNasi A per la proteina ricombinante.

La ribonucleasi pancreatica bovina è stata espressa e purificata utilizzando lo stesso protocollo dei derivati monomerici della BS-RNasi descritto nel capitolo 2 con rese sufficientemente elevate (circa 20 mg per litro di coltura).

Come nel caso della proteina nativa, dal monomero ricombinante della RNasi A in seguito a liofilizzazione al 40% da acido acetico si ottengono il monomero stesso, i due dimeri e oligomeri superiori. Il risultato ottenuto, mostrato in figura 3.6., riproduce esattamente i dati descritti in letteratura (Gotte et al., 1998).

Per verificare se e in che modo la sostituzione della regione cerniera nella RNasi A porti a variazioni nella struttura o nella stabilità dei dimeri ottenuti dalla liofilizzazione da acido acetico, è stato progettato il mutante *hBS*-RNasi A.

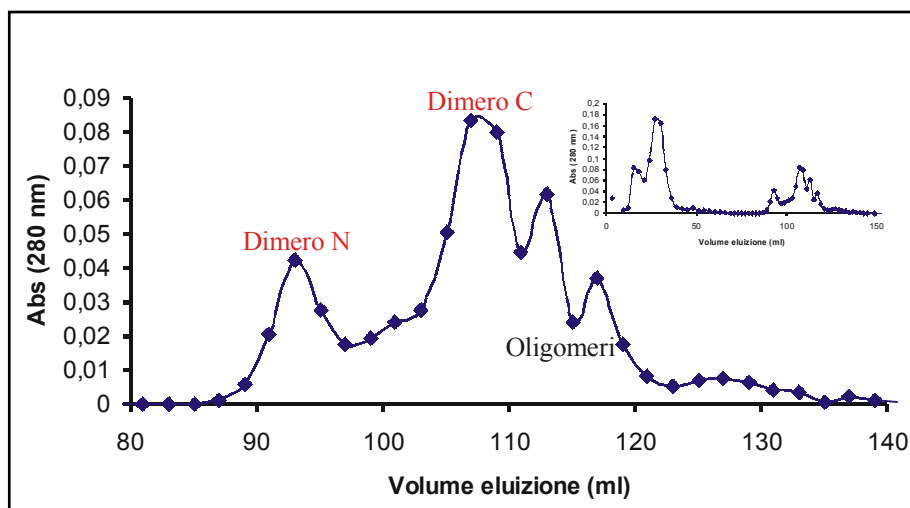


Figura 3.6.: Profilo di eluizione della cromatografia a scambio cationico della RNasi A, su resina di carbossimetil-cellulosa. Tampone iniziale sodio fosfato 85 mM pH 6.7, tampone finale sodio fosfato 180 mM pH 6.7.

La proteina espressa e purificata con le stesse rese della RNasi A è stata sottoposta a elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e native, per controllarne la purezza, mentre una caratterizzazione preliminare è stata ottenuta mediante dicroismo circolare. Lo spettro CD della proteina ha rivelato che essa è correttamente ripiegata, mentre la curva di denaturazione termica al CD ha mostrato una T_m pari a 63 °C, cioè 2°C più stabile della RNasi A.

Il mutante è stato liofilizzato da acido acetico sottoposto a cromatografia a scambio cationico: nel grafico riportato in figura 3.7. è illustrato il profilo di eluizione dopo aver applicato il gradiente, che mostra la separazione delle diverse specie oligomeriche ottenute dopo liofilizzazione. In attesa della caratterizzazione dei prodotti ottenuti, tutte frazioni sono state conservate a 4 °C.

Tutti i massimi dei picchi ottenuti dalla cromatografia a scambio ionico sono stati sottoposti a gel-elettroforesi in condizioni native, mediante la quale si è cercato di mettere in relazione il mutante della RNasi A con la proteina d'origine. Il risultato ottenuto è illustrato in figura 3.8.

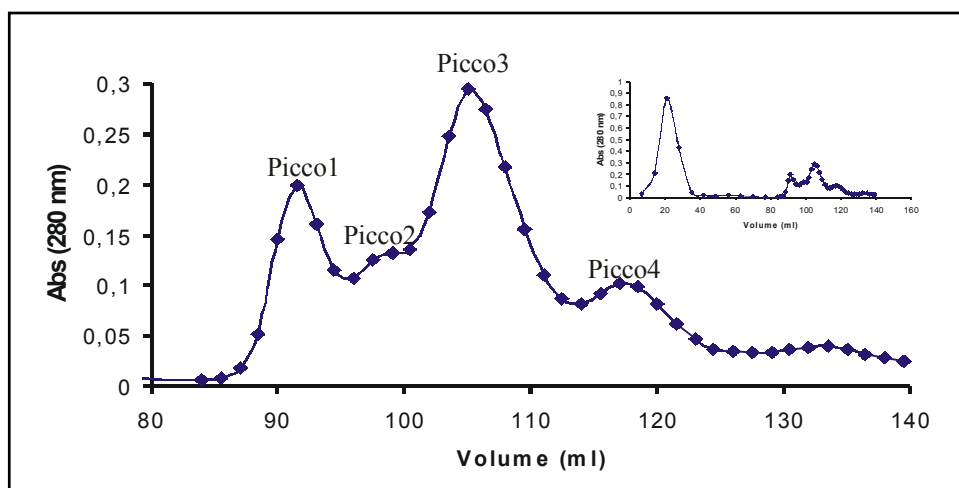


Figura 3.7.: Profilo di eluizione della cromatografia a scambio cationico di *hBS*-RNasi A su resina di carbossimetil-cellulosa. Tampone iniziale sodio fosfato 85 mM pH 6.7, tampone finale sodio fosfato 180 mM pH 6.7.

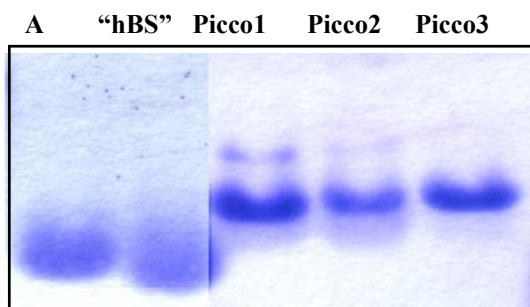


Figura 3.8.: Gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti di A= RNasi A; *hBS*= *hBS*-RNasi A; Picco1, Picco2 e Picco3 ottenuti dalla cromatografia a scambio ionico (vedi fig. 3.7.).

Il risultato ottenuto dal gel elettroforesi in condizioni native mostra che la proteina monomerica mutata, *hBS*-RNasi A, ha una migrazione minore rispetto alla proteina *wilde-type*. Degli oligomeri ottenuti in seguito alla liofilizzazione da acido acetico, i picchi 1, 2 e 3 hanno una migrazione molto simile tra loro e paragonabile a quella dei dimeri della RNasi A. L'analisi mediante gel filtrazione dei picchi ha confermato che il picco 4 è di natura trimerica mentre gli altri tre (picco 1, picco 2, picco 3) sono di natura dimerica.

L'analisi della dissociazione termica seguita mediante gel filtrazione ha mostrato che i picchi analizzati mediante gel elettroforesi hanno una stabilità differente tra loro e differente rispetto anche a quella dei dimeri della RNasi A. In particolare il picco 1 è risultato notevolmente stabile ($T_{1/2}$ =250 h), il picco 2 è il più instabile ($T_{1/2}$ =5 h) e mostra un tempo di dimezzamento molto simile a quello di NCD, mentre il picco 3 ha

una stabilità intermedia ma che risulta comunque maggiore di entrambi i dimeri della RNasi A ($T_{1/2}=43$ h).

Per verificare il comportamento della BS-RNasi alla liofilizzazione da acido acetico, che può simulare una situazione di stress ambientale, il derivato monomerico con le cisteine 31 e 32 alchilate con iodoacetammide è stato trattato secondo il protocollo descritto nel capitolo 2. La successiva gel-filtrazione della miscela di reazione ha evidenziato la formazione di una specie dimerica e di una piccola quantità di aggregati con peso molecolare superiore (figura 3.9). La resa di forma dimerica è stata del 22%.

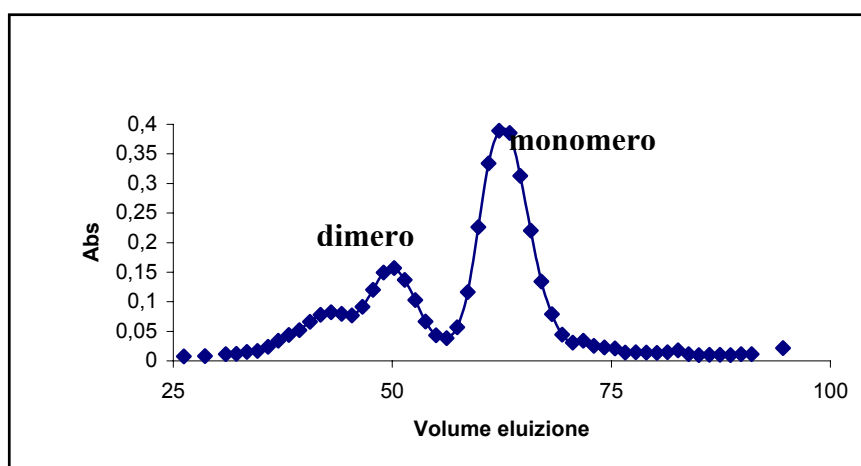


Figura 3.9.: Profilo di eluizione su gel filtrazione di mBS_{IIAA} dopo liofilizzazione da acido acetico al 40%.

Anche il mutante *hA*-mBS con le cisteine 31 e 32 alchilate con iodoacetammide (*hA*- mBS_{IIAA}) è stata liofilizzato da acido acetico al 40% e sottoposto a gel-filtrazione. La resa è stata del 23% di dimero, come mostrato in figura 3.9.

Una ulteriore caratterizzazione è stata eseguita mediante elettroforesi su gel nativo sia del mutante monomerico sia del dimero ottenuto in seguito a liofilizzazione da acido acetico dello stesso. Il risultato è riportato in figura 3.10.

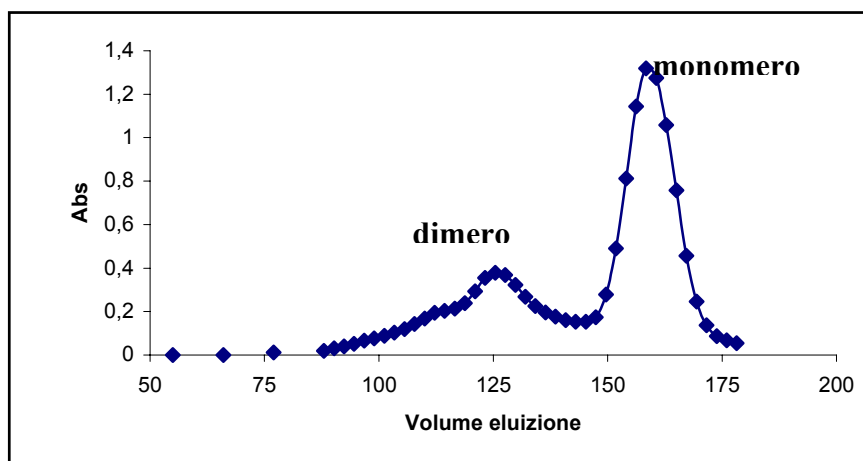


Figura 3.9.: Gel filtrazione su Sephadex G75 di hA-mBS_{IAA} dopo liofilizzazione da acido acetico al 40%.

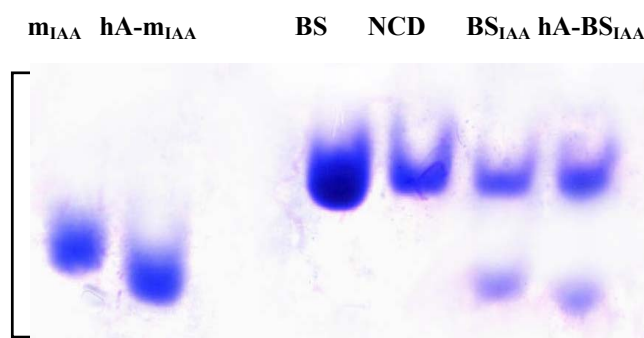


Figura 3.10.: Gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti di m_{IAA}= mBS_{IAA}; hA-m_{IAA}= hA-mBS_{IAA}; BS= BS-RNasi; NCD; BS_{IAA}= BS_{IAA}-RNasi e hA-BS_{IAA}= hA-BS_{IAA}-RNasi ottenuti dalla liofilizzazione da acido acetico dei rispettivi monomeri.

Il dimerico BS_{IAA}-RNasi ottenuto dalla liofilizzazione da acido acetico del corrispondente monomero ha una migrazione leggermente differente da quella del dimerico non covalente (NCD) mentre il monomero mutato della BS-RNasi (hA-mBS_{IAA}) ha una maggiore migrazione della proteina monomerica d'origine, per i dimeri BS_{IAA}-RNasi e hA-BS_{IAA}-RNasi non si riesce ad apprezzare una differenza di migrazione tra di loro e rispetto a NCD.

La struttura dei dimeri ottenuti non è nota e sono in corso esperimenti di cristallizzazione per ottenere cristalli adatti ad una analisi cristallografica. Nel frattempo, si è cercato di acquisire informazioni indirette attraverso il paragone con la forma di BS-RNasi ottenuta per riduzione selettiva dei ponti disolfurici dei ponti

intercatena dell'isoforma scambiata, e denominata NCD, di cui è nota la struttura cristallografica (Sica et al., 2004).

Come già riportato nell'introduzione, la BS-RNasi mostra un'attività citotossica nei confronti di cellule tumorali che sembra essere relazionabile alla sua capacità di sfuggire all'inibitore di ribonucleasi (RI). Questa attività è una proprietà peculiare della isoforma MxM: nell'ambiente riducente del citosol M=M dissocia nelle sue due componenti monomeriche, mentre MxM rimane come dimero non covalente (denominato NCD). Una ricostruzione grafica dei complessi tra l'inibitore proteico delle ribonucleasi (RI) e le forme dimeriche non covalenti a struttura nota di ribonucleasi rivela che NCD è il solo dimero dotato di una struttura quaternaria che può impedire la formazione del complesso con l'inibitore (Sica et al., 2004). Queste proprietà della struttura quaternaria di NCD sono quindi probabilmente alla base delle proprietà biologiche speciali dell'enzima seminale.

Nel paragrafi successivo si è cercato di paragonare le proprietà dei vari dimeri ottenuti con quelle di NCD.

3.5. Dissociazione termica delle proteine

Il vero interesse a questo punta diventa quello di riuscire a definire alcune proprietà dei dimeri ottenuti mediante liofilizzazione da acido acetico per poi paragonarle a quelle di forme dimeriche già note, il dimero C-terminale e il dimero N-terminale della RNasi A (denominati rispettivamente dC-RNasi A e dN-RNasi A), e il dimero non covalente sia della BS-RNasi (denominato NCD) sia di *hA*-BS-RNasi (denominato *hA*-NCD).

Dati riportati in letteratura dicono che i tempi di dimezzamento calcolati per NCD (Sica et al., 2004), per dC-RNasi A (Sorrentino et al., 2000) e dN-RNasi A (Sorrentino et al., 2000), sono, rispettivamente, pari a 7, 16 e 29 ore.

A tale scopo i vari dimeri, eluiti dalla gel-filtrazione in tampone fosfato, sono stati sottoposti a dialisi estensiva a 4°C ed equilibrati in tampone Tris/HCl 50 mM pH 7.3/ NaCl 0.13 M onde valutarne la stabilità termica. I campioni sono stati incubati a 37

°C e ne è stata seguita la dissociazione in monomero mediante gel-filtrazione su FPLC.

Riportando in grafico il logaritmo della percentuale di dimero presente in funzione del tempo di incubazione a 37 °C è stato possibile determinare il tempo di dimezzamento($T_{1/2}$) per ogni campione, che viene riportato in tabella 3.4.

Tabella 3.4.: Tempi di dimezzamento di NCD, *hA*-NCD, BS_{IAA} -RNasi, *hA*- BS_{IAA} -RNasi.

	$T_{1/2}$ a 37 °C
NCD ¹	5.0 ore
<i>hA</i> -NCD ¹	2.5 ore
BS_{IAA} ² -RNasi	1.5 ore
<i>hA</i> - BS_{IAA} ² -RNasi	0.6 ore

¹ Dimeri ottenuti per riduzione dei ponti disolfurici intercatena.

² Dimeri ottenuti per liofilizzazione da acido acetico.

Le proteine sono state conservate alla temperatura di 4 °C ed hanno mostrato anche a distanza di mesi una rilevante presenza dimerica.

Una ulteriore analisi è stata la determinazione della temperatura di denaturazione dei dimeri mediante CD, i risultati ottenuti sono mostrati in tabella 3.5.

Tabella 3.5.: Temperatura di denaturazione di NCD, BS_{IAA} -RNasi, *hA*- BS_{IAA} -RNasi

	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
NCD	56.0	56.0
BS_{IAA} -RNasi	56.0	56.0
<i>hA</i> - BS_{IAA} -RNasi	55.0	55.0

T_{m1} = temperatura di denaturazione determinata subito dopo gel filtrazione.

T_{m2} = seconda temperatura di denaturazione del campione precedentemente denaturato e lasciato a temperatura ambiente fino al completo raffreddamento.

I risultati ottenuti mostrano che i dimeri ottenuti in condizioni non fisiologiche hanno la stessa temperatura di denaturazione delle proteine monomeriche, indicando che la dissociazione dei dimeri avviene prima della denaturazione. Dopo il primo processo di denaturazione termica, che comporta il riscaldamento dei campioni fino a 82 °C, l'analisi per gel filtrazione ed elettroforesi su gel nativo ha mostrato che le proteine risultano dissociate nei rispettivi monomeri. Questi, a loro volta, mostrano una temperatura di denaturazione inalterata, indicando così un recupero totale della struttura secondaria.

3.6. Dati cristallografici

Le strutture cristallografiche dei due dimeri scambianti dei mutanti P19A-BS-RNasi e *hA*-BS-RNasi sono stati ottenuti in collaborazione con il gruppo del prof. Mazzearella. I cristalli, ottenuti partendo dalle due miscele all'equilibrio, presentano una morfologia molto simile e sono isomorfi rispetto alla proteina nativa (PDB Code 1R5D).

Le strutture dei due mutanti sono state ottenute usando dati ad una risoluzione di 2.20 Å e presentano entrambe una elevata somiglianza con BS.-RNasi dimostrando così che la sostituzione del peptide cerniera perturba solo marginalmente la struttura quaternaria dei mutanti, struttura che è fortemente vincolata dai ponti disolfurici intercatena e dall'interscambio dei domini.

La densità elettronica dell' *hinge* è significativamente più bassa di quella del resto della proteina. Nella isoforma nativa MxM, il peptide *hinge* assume due differenti conformazioni (F e E), entrambe caratterizzate dalla presenza di un β -turn 1-4 con la Pro19 nella seconda posizione di questo turn. Il cambiamento tra le due strutture avviene in corrispondenza della Gly16, che può adottare una conformazione ripiegata (F) o estesa (E) (fig. 3.11.).

Nella struttura F la catena laterale della Pro19 di una subunità si impacchetta tra le catene laterali della Tyr25 e Gln101 dell'altra subunità. Nella struttura E la

conformazione estesa della Gly16 determina una differente orientazione del β -turn e dispone la catena laterale della Pro19 fuori dalla tasca.

Nel cristallo della proteina nativa, isomorfo a quello dei mutanti, la conformazione F è stabilizzata dalla formazione di una serie di interazioni mediante legame a idrogeno con altre molecole, mentre l' *hinge* della conformazione E è relativamente libero

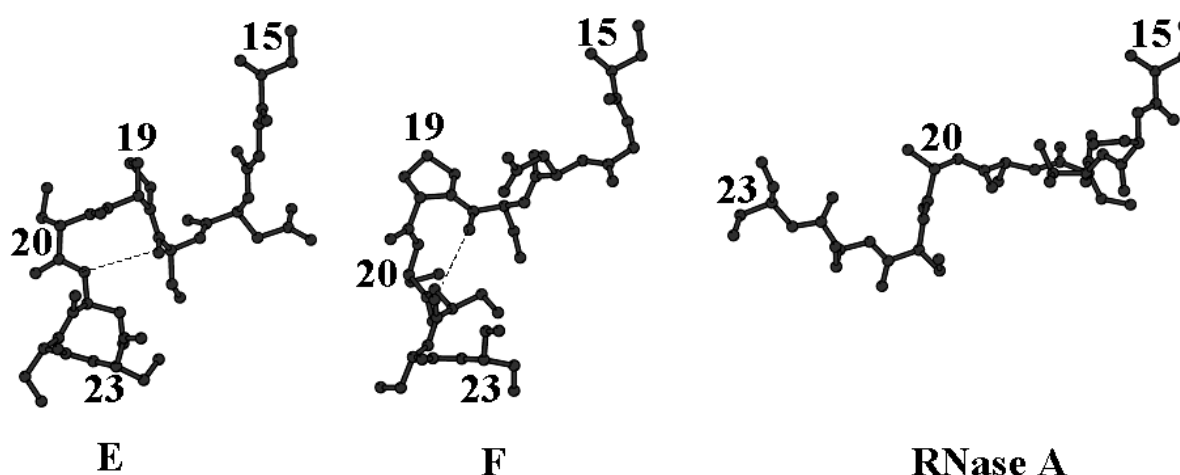


Figura 3.11.: Le due conformazioni accessibili del peptide *hinge* nel dimero scambiato della BS-RNasi riportate in confronto con quello della RNasi A.

Il peptide *hinge* di P19A-BS-RNasi corrispondente alla conformazione E è completamente disordinato, mentre il secondo peptide ha una struttura somigliante a quella della conformazione F. Rispetto all'enzima nativo il β -turn 1-4, comprendente i residui 18-21, è parzialmente distrutto, e la cavità ospitante la catena laterale della Pro19, è occupata in P19A-BS-RNasi da due molecole d'acqua. I risultati ottenuti indicano che la sostituzione della Pro19 con Ala incrementa considerevolmente la flessibilità della regione cerniera che è completamente disordinata in una catena e molto ordinata nell'altra, probabilmente a causa delle interazioni stabilizzanti formate nell'impaccamento del cristallo.

Sorprendentemente invece nel mutante *hA*-BS-RNasi entrambe le regioni cerniera presentano una migliore definizione strutturale rispetto a P19A-BS-RNasi. Anche in

questo caso, la conformazione dei due peptide *hinge* è differente nelle due catene e sono simili alle conformazioni F e E della proteina nativa, mostrando così che la sostituzione della Gly16 per una Ser non impedisce all' *hinge* di assumere la conformazione estesa.

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

Il fenomeno dell'interscambio delle estremità N- e C-terminali nelle ribonucleasi di tipo pancreatico continua a suscitare un grande interesse nella comunità scientifica (Eisenberg, 2005). In questo lavoro di tesi sono stati ottenuti dei mutanti della ribonucleasi seminale bovina in cui residui chiave responsabili dello swapping delle estremità N-terminali sono stati sostituiti con i residui corrispondenti della RNasi A. In particolare, si è posta l'attenzione sui residui localizzati nella regione cerniera (16-22), all'interfaccia aperta (Leu28) e nelle regioni che interagiscono con l' *hinge* (Arg80).

Un primo risultato interessante è quello ottenuto con i mutanti P19A, L28Q e P19A/L28Q della BS-RNasi, in cui i residui sostituiti sono localizzati nell' *hinge* e all'interfaccia aperta, rispettivamente. Studi strutturali NMR in soluzione sul derivato monomerico dell'enzima nativo (mBS) indicano che i residui di Pro19 e Leu28 sono esposti al solvente e formano solo un numero limitato di interazioni di van der Waals con il resto della proteina. Nei mutanti monomerici, sia gli spettri CD che quelli NMR suggeriscono una stretta somiglianza con mBS. La sola differenza osservata in seguito alla sostituzione di Pro con Ala è un lieve incremento della stabilità termica, che rende P19A-mBS più simile alla RNasi A. Nel mutante L28Q ci si aspettava che l'introduzione di un residuo con un maggiore carattere idrofilico in posizione 28 (Gln per Leu) aumentasse la stabilità del derivato monomerico, considerando soprattutto che le catene laterali sono completamente esposte al solvente. Contrariamente alle previsioni, invece, si osserva che la stabilità termica rimane invariata. Per spiegare questo dato si può ricordare che i dati NMR ottenuti sul derivato monomerico della ribonucleasi seminale bovina mostrano che l'elica che comprende i residui 24-32 (elica 2) è meno ordinata che nella RNasi A. Questo disordine, attribuito a prima

vista alla vicinanza con l'*hinge* 16-22, potrebbe invece essere dovuto alla catena laterale della Leu28 che, per evitare la sfavorevole esposizione al solvente, tenderebbe a rivolgersi verso l'interno della proteina. Il risultato finale può quindi essere dovuto a un bilanciamento fra l'entalpia, che favorisce la sostituzione operata, e l'entropia, che la sfavorisce.

Esaminando la tendenza all'interscambio nei dimeri, la sostituzione di Pro 19 con Ala sorprendentemente non mostra differenze rilevanti rispetto alla proteina nativa e tutti i risultati mostrano che questo residuo non ha alcun effetto sul processo di dislocazione dell'N-terminale. L'isomeria *cis-trans* delle proline è spesso indicata come un evento chiave nel folding delle proteine (Wedemeyer et al., 2002.); inoltre, è stata messa in evidenza la presenza di residui di prolina nelle regioni cruciali di molte proteine che danno "domain swapping", come appunto la BS-RNasi. Lo studio della cinetica di interconversione di BS-RNasi e P19A-BS-RNasi mostra che le due proteine raggiungono l'equilibrio tra le forme MxM ed M=M con la stessa velocità, suggerendo che nel processo di interconversione probabilmente non è coinvolta una isomeria *cis-trans* della Pro19.

Le similitudini osservate tra L28Q-BS-RNasi e PALQ-BS-RNasi, offrono una ulteriore indicazione della mancanza di un ruolo chiave del residuo di Pro 19 nel fenomeno dell'interscambio delle estremità N-terminali.

Un ulteriore mutante è stato ottenuto mediante la sostituzione dell'intero *hinge* della BS-RNasi con quello della RNasi A (*hA*-BS-RNasi) che non ha mostrato effetti significativi sulla composizione all'equilibrio della miscela MxM/M=M e sulla cinetica di interconversione. Anche i dati su questo mutante indicano che la presenza della Pro nel peptide *hinge* non sembra essere così importante come invece appare essere in altre proteine che presentano il fenomeno dello scambio di domini (Rousseau et al., 2003). Va sottolineato tuttavia che, per tutte queste proteine, il *domain swapping* è un processo che avviene tra due diversi stati di aggregazione della proteina, in generale una forma monomerica ed una dimerica, viceversa la ribonucleasi seminale è l'unico esempio in cui il processo di scambio dell'elica N-

terminale coinvolge due forme dimeriche definite da una struttura quaternaria che rimane inalterata, essendo essa di fatto vincolata dalla presenza dei due ponti disolfurici intercatena. Ci si aspetta quindi che anche variazioni nella sequenza del peptide cerniera influenzino poco la organizzazione quaternaria della proteina. Infatti la risoluzione delle strutture cristallografiche delle isoforme scambiate di P19A- BS-RNasi e *hA*-BS-RNasi ha mostrato che, a parte piccoli aggiustamenti, le due proteine sono molto simili alla proteina MxM nativa.

Per la forma MxM di questi due mutanti, i dati cristallografici mostrano che il peptide *hinge* è molto più mobile che nella proteina nativa. Non sono stati raccolti dati cristallografici sulle isoforme non scambiate (M=M) dei mutanti ottenuti, niente si può dire quindi sulle proprietà strutturali dei loro peptidi cerniera. Questa regione è in realtà fortemente disordinata nell'isoforma M=M dell'enzima nativo (Berisio et al., 2003) e nel suo derivato monomerico (Sica et al., 2003). Considerando che in M=M la coda N-terminale è ripiegata nel corpo della stessa subunità è possibile supporre che il folding dell' *hinge* sia lo stesso per il monomero e per M=M. Dati NMR dei derivati monomerici mutanti indicano una elevata flessibilità della regione 16-22, suggerendo che per queste proteine le forme non scambiate presentano un disordine dell' *hinge* simile a quello della proteina nativa.

In conclusione è possibile affermare che la sostituzione della regione cerniera (16-22) della BS-RNasi con i corrispondenti residui della RNasi A incrementa la flessibilità del peptide *hinge* scambiato, riducendo così, rispetto alla proteina nativa, la perdita entropica che accompagna la trasformazione M=M in MxM. D'altro canto, nella forma MxM di *hA*-BS-RNasi, la distruzione dell'interazione stabilizzante della catena laterale della Pro19 con la cavità formata dalle catene laterali di Tyr25 e Gln 101 (Picone et al., 2005), riduce il guadagno entalpico nella stessa trasformazione. L'insensibilità dell'equilibrio di interconversione, nonostante la sostituzione dell'intera regione cerniera, fa pensare che questo sia il risultato di un sostanziale bilancio degli effetti entalpici ed entropici.

Da un punto di vista evolucionistico questi risultati contrastano l'aspettativa generale che la sostituzione del peptide "hinge" dell'enzima seminale con quello pancreatico possa in qualche modo alterare la propensione allo scambio della BS-RNasi.

Dati NMR hanno mostrato che l'introduzione di una Ser in posizione 80 sposta la conformazione del peptide *hinge* di *hA*-mBS verso quella della RNasi A, con probabile ricostituzione del legame a idrogeno tra Ser80 e Ser18 che ha un ruolo stabilizzante di questa conformazione nella RNasi A. Questo risultato è in accordo con la maggiore stabilità termica del mutante R80S/*hA*-mBS, la cui temperatura di denaturazione è di circa 2°C più alta di quella di R80S-mBS. Per le considerazioni fatte in precedenza si può supporre che questo legame contribuisca anche alla stabilizzazione dell'isoforma M=M del mutante R80S/*hA*-BS-RNasi. Al momento non ci sono dati strutturali sulle due isoforme mutate, ma è possibile ipotizzare che in MxM l' *hinge* sia parzialmente disordinato, poiché nella conformazione necessaria per lo swapping, esso risulta troppo distante per poter formare il legame ad idrogeno, che invece si può formare nella forma non scambiante: questa differenza può pertanto giustificare lo spostamento dell'equilibrio di isomerizzazione verso M=M.

Questi risultati evidenziano che, nell'ambito di una ben definita struttura quaternaria dettata dai due ponti disolfurici intercatena, il fenomeno di scambio dei tratti N-terminali appare essere poco dipendente dalla natura dei residui che compongono il peptide *hinge*, e sorprendentemente più influenzato da una singola mutazione quale la sostituzione in posizione 80 di Arg con Ser piuttosto che da sostituzioni all'interno del peptide cerniera.

Una serie di informazioni aggiuntive sugli effetti della struttura primaria della BS-RNasi sul fenomeno dell'interscambio di domini è stata ottenuta mediante lo studio di questo fenomeno in condizioni non fisiologiche, cioè ottenendo i dimeri in seguito a liofilizzazione da acido acetico. Lo studio è stato condotto su m-BS, sul mutante della BS-RNasi contenente nella regione 16-22 la sequenza della RNasi A (*hBS*-RNasi) e sul suo complementare *hA*-BS-RNasi, cioè il mutante della RNasi A contenente nel tratto 16-22 i residui dell'enzima seminale.

Il primo risultato ottenuto è stato che, contrariamente ai dati riportati in letteratura, anche il derivato monomerico della BS-RNasi con le Cys31 e 32 bloccate con iodoacetammide (IAA) liofilizzato da acido acetico forma una specie dimerica che, in tutte le verifiche effettuate (migrazione elettroforetica in condizioni native, cromatografia a scambio ionico, dissociazione termica), è risultata differente dal dimero non covalente NCD, ottenuto mediante riduzione selettiva e alchilazione della forma MxM della BS-RNasi. Non è escluso quindi che la BS-RNasi possa formare un dimero mediante dislocazione del tratto C-terminale.

Anche il mutante della BS-RNasi contenente l' *hinge* della RNasi A (*hA*-mBS_{IAA}), in seguito alla liofilizzazione da acido acetico, dà luogo a una unica specie dimerica ma non è stato possibile al momento fornire alcuna caratterizzazione strutturale del dimero ottenuto, quindi anche in questo caso non è possibile scartare la possibilità di uno scambio al C-terminale. Per questo mutante, è stata evidenziata una stabilità termica inferiore a quella del dimero ottenuto per liofilizzazione da acido acetico di mBS_{IAA}.

Analizzando invece i risultati ottenuti per il mutante della RNasi A contenente l' *hinge* della BS-RNasi (*hBS*-RNasi A) è stato evidenziato che già la forma monomerica mostra alcune differenze con la proteina d'origine, come una minore migrazione elettroforetica in condizioni native così come succede per il mutante PM8 (Canals et al., 2001), cioè per la variante della ribonucleasi pancreatica umana (HP-RNasi) in cui tutta la coda N-terminale (tratto di catena 1-20) è stata sostituita con quella della BS-RNasi. L'osservazione che invece *hA*-mBS ha una migrazione elettroforetica su gel nativo maggiore di mBS fa pensare che la differente conformazione assunta dai due peptidi cerniera induca modifiche strutturali che alterano il raggio idrodinamico, che risulta minore quando nella proteina è presente nel tratto 16-22 la sequenza della RNasi A (STSAASS) e maggiore quando la sequenza è quella della BS-RNasi (GNSPSSS). D'altro canto la presenza di una maggiore attività enzimatica ed uno spettro CD lievemente modificato confermano l'ipotesi di modifiche strutturali indotte dall' *hinge*. Invece per *hBS*-RNasi A è stata

evidenziata la presenza di numerose specie, tra le quali sono state individuate tre dimeri e almeno un trimero. La caratterizzazione di queste specie ha mostrato tuttavia alcuni dati estremamente promettenti. Dei tre dimeri due sono stati tentativamente identificati come dimeri N e l'altro come dimero C, ma la loro peculiarità è che vengono prodotti in quantità minore rispetto al dN-RNasi A, ma soprattutto hanno una stabilità termica completamente differente tra di loro e a quella del dN-RNasi A. Il primo dimero N-terminale (identificato come PICCO1) mostra sorprendentemente un tempo di dimezzamento di circa 250 ore, mentre il secondo di circa 5 ore. L'ipotesi più plausibile è che il PICCO1 corrisponda ad un dimero N tipo PM8 e che la sua elevata stabilità sia dovuta alla sua capacità di poter formare un interfaccia aperta simile a quella del dN-RNasi A, che tra i possibili dimeri non covalenti delle due ribonucleasi è sicuramente quella che forma un maggiore numero di legami a H tra le due subunità, ma in più ha la possibilità di bloccare le due Pro19 tra le catene laterali di Gln101 e Tyr25, aumentando enormemente le interazioni tra le due subunità.

In conclusione tutti i dati raccolti in questo lavoro di tesi, alcuni dei quali ancora da confermare mediante indagini strutturali, indicano che la sostituzione dei residui del peptide cerniera nella BS-RNasi non alterano, in condizioni fisiologiche, la sua propensione allo scambio, controllata invece da residui esterni a questa regione come la Leu28 e l' Arg80. D'altro canto lo studio del *domain swapping* in condizioni non fisiologiche ha messo in evidenza che sostituendo i residui dell' *hinge* della BS-RNasi con quelli della RNasi A, sia il dimero non covalente ottenuto per riduzione dei ponti disolfurici intersubunità di MxM sia quello ottenuto per liofilizzazione da acido acetico, mostrano una minore stabilità agli esperimenti di dissociazione termica. Sostituendo invece l' *hinge* della RNasi A con i residui della BS-RNasi è possibile ottenere un dimero che ha una stabilità termica molto più alta dei dimeri formati dalla RNasi A. Il ruolo di queste mutazioni sembrerebbe essere quindi non solo quello di favorire la struttura quaternaria del dimero non covalente della BS-RNasi (NCD), cioè il dimero senza i ponti disolfurici, in grado di sfuggire

all'inibitore di ribonucleasi e considerato responsabile dell'attività antitumorale dell'enzima, ma anche sfavorire una struttura simile sia a quella del dN-RNasi A sia a PM8, che anche se termicamente più stabili non sono in grado di sfuggire all'inibitore citosolico e quindi meno favoriti dal punto di vista biologico.

BIBLIOGRAFIA

- Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J, Morán, F. (1993) *Prot. Eng.* **6**, 383-390.
- Avitabile, F., Alfano, C., Spadaccini, R., Crescenzi, O., D'Ursi, A.M., D'Alessio, G., Tancredi, T., and Picone, D. (2003) *Biochemistry* **42**, 8704-8711.
- Bennet, M.J., and Eisenberg, D. (2004). *Structure*. **12(8)**,1339-1341.
- Bennet, M.J., Schlunegger, M.P., and Eisenberg, D. (1995). *Protein Science* **4**, 2455-2468.
- Bergdoll, M., Remy, M.H., Cagnon, C., Masson, J.M., and Dumas, P. (1997) *Structure* **5**, 391-401.
- Berisio, R., Sica, F., De Lorenzo, C., Di Fiore, A., Piccoli, R., Zagari, A., and Mazzarella, L. (2003) *FEBS Lett.* **554**, 105-110.
- Berisio, R., Sica, F., Lamzin, V.S., Wilson, K.S., Zagari, A., and Mazzarella, L. (2002). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **58(Pt 3)**, 441-450.
- Blazquez, M., Fominaya, J.M., and Hofsteenge, J. (1996) *J Biol Chem.* **271**, 18638-18642.
- Cafaro, V., De Lorenzo, C., Piccoli, R., Bracale, A., Mastronicola, M.R., Di Donato, A., and D'Alessio, G. (1995). *FEBS Lett.* **359**, 31-34.
- Canals, A., Pous, J., Gulasch, A., Benito, A., Ribo, M., Vilanova, M., and Coll, M. (2001). *Structure (Camb)*, **9(10)**, 967-976.
- Caspar, DLD. (1980). *Biophys. J.* **32**, 103-138.
- Ciclig, M.I., Jackson, P.J., Trobesinger-Ruf, N., and Benner, S.A. (1998). *Biochemistry* **37**, 4008-4022.
- Crestfield, A.M., Stein, W.H., and Moore, S. (1962). *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* **1**, 217-222.
- D'Alessio, G., Di Donato A., Parente, A., Piccoli, R. (1991). *Trends Biochem.* **16**, 104-106.
- D'Alessio, G., Malorni, M. C., and Parente, A. (1975). *Biochemistry.* **14**, 1116-1122.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) *J. Biomol. NMR* **6**, 277-293.

- Di Donato, A., and D'Alessio, G. (1981). *Biochemistry* **20**, 7232-7237.
- Di Donato, A., Cafaro, V., and D'Alessio, G. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 17394-17396.
- Di Donato, A., Cafaro, V., Romeo, I., and D'Alessio, G. (1995). *Protein Sci.* **4**, 1470-1477.
- Di Donato, A., Galletti, P., and D'Alessio, G. (1986). *Biochemistry* **25**, 8361-8368.
- Di Donato, A., Piccoli, R., and D'Alessio, G. (1987). *Biochem. J* **241**, 435-440.
- Ercole, C., Avitabile, F., Del Vecchio, P., Crescenzi, O., Tancredi, T., and Picone, D., (2003). *Eur. J. Biochem.* **270**, 4729-4735.
- Floridi, A., D'Alessio, G., and Leone, E. (1972). *Eur. J. Biochem.* **26**, 162-167.
- Gotte, G., and Libonati, M. (1998). *Biochim Biophys Acta.* **1386(1)**, 106-12.
- Green, S.M., Gittis, A.G., Meeker, A.K., and Lattman, E.E. (1995). *Nat. Struct. Biol.* **2(9)**, 746-751.
- Haigis, M.C., and Raines, R.T. (2003) *J Cell Sci.* **116**, 313-324.
- Hirs, C.H.W., Moore, S., and Steine, W.H. (1960). *J. Biol. Chem.* **235**, 633-647.
- Irie, M. (1997). *Yakugaku Zasshi* **117**, 561-582.
- Jaenicke, R. (1995). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **348**, 97-105.
- Johnson, B.A., and Blevins, R.A. (1994) *J. Biomol. NMR* **4**, 603-614.
- Kartha, G., Bello, J., and Harker, D. (1967). *Nature (London)* **213**, 862-865.
- Kikuchi, Y., King, J. (1975). *J. Mol. Biol.* **99**, 645-647.
- Kim, J.S., Soucek, J., Matoušek, J., and Raines, R.T. (1995a). *J. Biol. Chem.* **270**, 10525-10530.
- Kim, J.S., Soucek, J., Matoušek, J., and Raines, R.T. (1995b). *Biochem.J.* **308**, 547-550.
- Klafki, W.H., Pick, A.I., Pardowitz, I., Cole, T., Awni, L.A., Barnikol, H.U., Mayer, F., Kratzin, H.D., Hilschmann, N. (1993). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 1117-1122.
- Klink, T.A., and Raines, R.T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275 (23)**, 17463-17467.
- Klink, T.A., Woycechowsky, K.J., Taylor, K.M., and Raines, R.T. (2000). *Eur. J. Biochem.* **267(2)**, 566-572.

- Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W.K., Yee, V.C. (2001). *Nat. Struct. Biol.* **8(9)**, 770-774.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1993). *Nature* **366(6457)**, 75175-6.
- Koshland, D.E. Jr., Nemethy, G., Filmer, D. (1966). *Biochemistry* **5**: 365-385.
- Kunitz, M., (1946) *J. Biol. Chem.* **164**, 563-568.
- Laity, J.H., Shimotakahara, S., and Sheraga, H.A. (1993) *Proc.Natl. Acad.* **90**, 615-619.
- Lee, S., and Eisenberg, D. (2003). *Nat. Struct. Biol.* **10(9)**, 725-730.
- Leland, P.A., Schultz, L.W., Kim, B.M., and Raines, R.T. (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* **95(18)**, 10407-10412.
- Libonati, M., and Floridi, A. (1969). *Eur. J. Biochem.* **8**, 81-87
- Libonati, M., and Gotte, G., (2004). *Biochem J.* **380(Pt 2)**, 311-327.
- Libonati, M., Sorrentino, S., Galli, R., La Montagna, R., and Di Donato, A. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* **407**, 292-298.
- Liu, Y., and Eisenberg, D. (2002). *Protein Science* **11**, 1285-1299.
- Liu, Y., Gotte, G., Libonati, M., Eisenberg, D. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8 (3)**, 211-214.
- Liu, Y., Hart, P.J., Schlunegger, M.P., Eisenberg, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3437-3442.
- Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2002) *Bioinformatics* **18**, 211-212.
- Mastronicola, M.R., Piccoli, R., D'Alessio, G., (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**, 242-249.
- Matousek, J. (1973). *Experimentia* **29**, 858-859.
- Mazzarella, L., Capasso, S., Demasi, D., Di Lorenzo, G., Mattia, C., and Zagari, A. (1993). *Acta Crystallogr. D* **49**, 389-402.
- Mazzarella, L., Vitagliano, L., and Zagari, A. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3799-3803.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965). *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.

Ogihara, N.L., Ghirlanda, G., Bryson, J.W., Gingery, M., De-Grado, W.F., and Eisenberg, D. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(4), 1404-1409.

Opitz, J.G., Ciglic, M.I., Haugg, M., Trautwein-Fritz, K., Raillard, S.A., Jermann, T.M., and Benner, S.A.. (1998). *Biochemistry* **37**(12), 4023-4033.

Piccoli, R., Di Donato, A., and D'Alessio, G. (1988). *Biochem. J.* **253**, 329-336.

Piccoli, R., Di Donato, A., Dudkin, S., and D'Alessio, G. (1982). *FEBS Lett.* **140**, 307-310.

Piccoli, R., Tamburrini, M., Piccialli, G., Di Donato, A., Parente, A., and D'Alessio, G. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1870-1874.

Roth, J.S. (1962). *Biochim Biophys Acta* **61**, 903-915.

Rousseau, F., Schymkovitz, J.W.H., and Itzaki, L.S. (2003). *Structure* **11**, 243-251.

Russo, A., Antignani, A., Giancola, C., and D'Alessio, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 48643-48649.

Russo, N., Antignani, A., and D'Alessio, G. (2000). *Biochemistry* **39**(13), 3585-3591.

Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M.R., Gingery, M., and Eisenberg, D. (2005) *Nature* **437**, 266-9.

Schlunegger, M.P., Bennett, M.J., Eisenberg, D. (1997). *Adv. Protein Chem.* **50**, 61-122.

Sela, M., White, F.H., and Anfinsen, C.B. (1957). *Science* **125**, 691-692.

Shimotakahara, S., Rios, C.B., Zimmerman, J.H., Sheraga, H.A., and Montelione, G.T. (1997) *Biochemistry* **36**, 6915-6929.

Sica, F., Di Fiore, A., Merlino, A., and Mazzearella, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 36753-36760.

Smyth, D.G., Stein, W.H., and Moore, S. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 227-234.

Sorrentino, S., and Libonati, M. (1994). *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 340-348.

Sorrentino, S., Barone, R., Bucci, E., Gotte, G., Russo, N., Libonati, M., and D'Alessio, G., (2000) *FEBS Letters* **466**, 35-39.

Taniguchi, T., and Libonati, M. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 280-286.

Vatzaki, E.H., Allen, S.C., Leonidas, D.D., Trautwein-Friz, K., Stackhouse, J., Benner, S.A., and Acharya, R. (1999). *Eur.J.Biochem.* **260**, 176-182.

Vescia, S., Tramontano, D., Augusti-Tocco, G., and D'Alessio, G. (1980). *Cancer Res.* **40**, 3740-3744.

Wedemeyer, W., Welker, E. & Scheraga, H. (2002) *Biochemistry* **41**, 14637-14644.

Wyckoff, H.W., Hardam, K.D., Allewell, N.M., Inagam, T., Johnson, L .N., and Richards, F.M. (1967). *J. Biol. Chem.* **242**, 3984-3988.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare innanzitutto la professoressa Delia Picone che nel percorso formativo iniziato con la tesi di laurea e continuato con i tre anni di dottorato mi ha consentito di crescere dal punto di vista scientifico ma anche, e ciò non è meno importante, sotto il profilo umano.

Ringrazio il professore Lelio Mazzearella per i suoi consigli e la sua disponibilità.

Ringrazio tutti i gli colleghi, nonché amici, che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro: Teodorico, Simona e Caterina per gli esperimenti NMR; Gennaro, Melania e Luisa per il lavoro biochimico; il gruppo del prof. Mazzearella nelle persone della professoressa Filomena Sica e della dottoressa Anna Di Fiore per i dati cristallografici.

Infine un ringraziamento particolare va a mia moglie e alla mia famiglia per il loro continuo supporto, incoraggiamento e per la loro pazienza.